

UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA



ACTIVIDAD DE Bacillus thuringiensis (BERLINER)
GM1, GM2; GM-7-GM-19 SOBRE Heliothis virescens
(FABRICIUS)

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

PRESENTAN
OSCAR TORRES MORALES
DAVID MARQUEZ HERNANDEZ

MARIN, N. L.

JULIO DE 1985

T

SB975

T6

c.1



1080063752

UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA



ACTIVIDAD DE Bacillus thuringiensis (BERLINER)
GM1, GM2; GM-7-GM-19 SOBRE Heliothis virescens
(FABRICIUS)

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

PRESENTAN
OSCAR TORRES MORALES
DAVID MARQUEZ HERNANDEZ

MARIN, N. L.

JULIO DE 1985

6656

DM

40.63
FA4
1985
C.5



Biblioteca Central
Magna Solidaridad

F. Tesis



BURaúl Rangel Funes
UANL
FONDO
TESIS LICENCIATURA

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

SR. JUAN MANUEL TORRES MORALES

SRA. HORTENSIA MORALES DE TORRES

A MIS TIOS:

LIC. BENITO MORALES SALAZAR

SRA. IRMA RIZZI DE MORALES

ING. ARTURO EQUIHUA EQUIHUA

SRA. MARIA DEL CARMEN MORALES DE EQUIHUA

A MIS HERMANOS:

MARIA GUADALUPE

JUAN MANUEL

HORTENSIA

RICARDO

MARISELA

PATRICIA

VERONICA

A MI NOVIA:

SRITA. ELVA LINA LAZCANO SERRATO

Y a todos mis familiares y amigos quienes de alguna forma contribuyeron a mi formación profesional. A ellos dedico este trabajo.

OSCAR TORRES MORALES

DEDICATORIAS

A MIS PADRES :

SR. LADISLAO MARQUEZ ARTEAGA

SRA. MARIA MELQUIADES HERNANDEZ DE MARQUEZ

A MI ABUELA :

SRA. MARIA SEGURA TOVAR

A MIS HERMANOS :

LADISLAO

JUAN ANTONIO

MARIA GUADALUPE

ROSA MARIA

ELIZABETH

A MI NOVIA :

SRITA. VIRGINIA SANTACRUZ GARCIA

A TODOS MIS FAMILIARES Y AMIGOS

A todos ellos por su gran apoyo y comprensión para la realización de este trabajo y carrera profesional.

DAVID MARQUEZ HERNANDEZ

AGRADECIMIENTOS

A EL CATEDRATICO ASESOR DEL PRESENTE

TRABAJO DE TESIS.

ING. CUAUHTEMOC NUÑEZ RAMOS

A LA FUNDACION MARTINEZ SADA POR EL
APOYO QUE BRINDARON PARA LA CULMINA
CION DE MIS ESTUDIOS PROFESIONALES.

A:

ING. MARCO VINICIO GOMEZ MEZA

ING. NEPHTALI GONZALEZ GONZALEZ

BIOL. HAZAEL M. GUTIERREZ

ING. ALFONSO TOVAR RODRIGUEZ

ING. JOSE DE JESUS TREVIÑO MARTINEZ

DRA. AURORA GARZA ZUÑIGA

ING. CARLOS OCHOA GOMEZ

LAB. CARLOS MARTINEZ REYNA

Por el apoyo brindado.

Y A TODAS LAS PERSONAS QUE DE UNA U OTRA FORMA CONTRIBUYERON
A LA REALIZACION Y TERMINACION DEL PRESENTE TRABAJO.

I N D I C E

	PAGINA
1. INTRODUCCION.....	1
2. LITERATURA REVISADA.....	4
2.1. Control microbiológico de insectos.....	4
2.1.1. Antecedentes.....	4
2.1.2. Importancia del control microbiológico de insectos.....	6
2.1.2.1. Algunos agentes de control microbial...	8
2.1.3. Generalidades del control microbiológico de insectos en México.....	9
2.2. <u>Bacillus thuringiensis</u> en el control micro- biológico de insectos.....	11
2.2.1. Descubrimientos de <u>B. thuringiensis</u>	11
2.2.2. Descripción de <u>Bacillus thuringiensis</u>	13
2.2.2.1. Posición taxonómica.....	13
2.2.2.2. Características del género <u>Bacillus</u>	15
2.2.2.3. Características específicas de <u>Bacillus</u> <u>thuringiensis</u>	15
2.2.3. Modo de acción de <u>Bacillus thuringiensis</u> .	17
2.2.3.1. Parálisis general.....	19
2.2.3.2. Parálisis intestinal.....	19

	PAGINA
2.2.4. Toxinas de <u>Bacillus thuringiensis</u>	20
2.2.5. El cristal parasporal de <u>Bacillus thuringiensis</u>	22
2.2.6. Ecología de <u>Bacillus thuringiensis</u>	23
2.2.7. Bioensayos de <u>Bacillus thuringiensis</u>	25
2.2.8. Insectos susceptibles a <u>Bacillus thuringiensis</u>	27
2.2.9. Estudios de la actividad de <u>Bacillus thuringiensis</u>	29
2.3. Generalidades sobre <u>Heliothis virescens</u> ...	30
2.3.1. Importancia, daños, hospederos y distribución de <u>H. virescens</u>	30
2.3.2. Posición taxonómica y descripción morfológica.....	31
2.3.2.1. Características de la familia <u>Noctuidae</u> .	32
2.3.2.2. Características específicas de <u>Heliothis virescens</u>	32
2.3.3. Ciclo biológico y hábitos de <u>Heliothis virescens</u>	33
2.3.4. Métodos de control de <u>Heliothis virescens</u> .	34
2.3.5. <u>Bacillus thuringiensis</u> en el control de <u>Heliothis virescens</u>	36

	PAGINA
3. MATERIALES Y METODOS.....	38
3.1. Ubicación.....	38
3.2. Desarrollo larval.....	38
3.3. Pupación.....	39
3.4. Emergencia de Adultos y Oviposición.....	39
3.5. Bioensayos.....	40
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	42
4.1. Reducción del peso larval.....	42
4.2. Reducción de longitud larval.....	50
4.3. Porcentaje de mortalidad larval.....	55
4.4. Discusión general.....	60
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	65
6. RESUMEN.....	68
7. BIBLIOGRAFIA.....	70

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA		PAGINA
1	Historia de los descubrimientos de las variedades de <u>Bacillus thuringiensis</u> ..	18
2	Resultados de las variables: peso, longitud y porcentaje de mortalidad en larvas de primer instar de <u>Heliothis virescens</u> sometidas a la actividad de seis cepas <u>Bacillus thuringiensis</u> por 72 horas.....	43
3	Resultados de las variables: peso, longitud y porcentaje de mortalidad en larvas de primer instar de <u>Heliothis virescens</u> sometidas a la actividad de diez cepas de <u>Bacillus thuringiensis</u> por 72 horas.....	44
4	Transformación $\sqrt{X + 1}$ de los pesos promedio de larvas de <u>Heliothis virescens</u> sometidas a la actividad de seis cepas de <u>Bacillus thuringiensis</u> por 72 horas.....	46
5	Transformación $\sqrt{X + 1}$ de los pesos promedio de larvas de <u>Heliothis virescens</u> sometidas a la actividad de ocho cepas de <u>Bacillus thuringiensis</u> por 72 horas.....	46
6	Análisis de varianza de los pesos larvales transformados a $\sqrt{X + 1}$ -Experimento I-	47
7	Análisis de varianza de los pesos larvales transformados a $\sqrt{X + 1}$ -Experimento II-	47

8	Comparación de medias en pesos larvales de <u>Heliothis virescens</u> inoculadas con 500 μ g de <u>Bacillus thuringiensis</u> po ml. de dieta artificial.....	48
9	Análisis de varianza de longitud larval. Experimento I.....	51
10	Análisis de varianza de longitud larval. Experimento II.....	51
11	Comparación de medias para longitud larval de <u>Heliothis virescens</u>	53
12	Larvas de <u>Heliothis virescens</u> que sobrevivieron después de 72 horas en dieta inoculadas con 500 μ g de <u>Bacillus thuringiensis</u> GM-7 a GM-11 por ml. de dieta.....	56
13	Larvas de <u>Heliothis virescens</u> que sobrevivieron después de 72 horas en dietas inoculadas con 500 μ g de <u>Bacillus thuringiensis</u> GM-1, GM-2; GM-13 a GM-19 por ml. de dieta.....	56
14	Análisis de varianza para larvas de <u>Heliothis virescens</u> , que sobrevivieron en dietas inoculadas con 500 μ g de <u>Bacillus thuringiensis</u> GM-7 a GM-12 por ml. de dieta.....	57
15	Análisis de varianza para larvas de <u>Heliothis virescens</u> que sobrevivieron en dietas inoculadas con 500 μ g de <u>Bacillus thuringiensis</u> GM-1, GM-2; GM-13 a GM-19 por ml. de dieta.....	57

TABLA

PAGINA

16	Comparación de medias de los tratamientos correspondientes a cepas de <u>Bacillus thuringiensis</u> medidas en su actividad contra larvas de <u>Heliothis virescens</u>	58
----	---	----

FIGURA

1	Porcentaje de reducción de pesos larvales. Experimento I.....	49
2	Porcentaje de reducción de pesos larvales. Experimento II.....	49
3	Porcentaje de reducción del tamaño larval. Experimento I.....	54
4	Porcentaje de reducción del tamaño larval. Experimento II.....	54
5	Porcentaje de mortalidad larval de <u>H. virescens</u> al inocularse con diferentes cepas de <u>B. thuringiensis</u> . Experimento I.....	59
6	Porcentaje de mortalidad larval de <u>H. virescens</u> al inocularse con diferentes cepas de <u>B. thuringiensis</u> . Experimento II.....	59

I. INTRODUCCION

En los últimos años, el combate de las plagas agrícolas se ha venido complicando con la utilización de métodos de control tradicionales. En el caso de los químicos, la alta residualidad de algunos productos, la contaminación que originan al medio ambiente, y la necesidad de aplicar dosis cada vez mayores para controlar a una misma plaga, han sido algunos de los problemas más serios que dificultan su utilización.

Debido a esto, la búsqueda de métodos de control de plagas se ha intensificado y hoy en día, es la meta de numerosas investigaciones.

El Control Microbial o Control Microbiológico es una alternativa que ha dado muestras de ser bastante efectivo y que incluso en algunos países se utiliza ya comercialmente y con resultados bastante halagadores.

Entre los microorganismos causantes de enfermedades en insectos se encuentran algunas bacterias, hongos, virus, nemátodos y protozoarios.

Bacillus thuringiensis (Berliner) es una bacteria que ha sido ampliamente investigada debido a la elevada toxicidad que presenta en larvas de lepidopteros, la cual se encuentra pre-

sente en el medio ambiente, y puede ser producida en medios de fermentación en grandes cantidades.

Dentro de esta especie se han identificado un gran número de serotipos, algunos de los cuales han presentado un alto grado de toxicidad en alguna plaga específica.

Varios serotipos de B. thuringiensis se utilizan comercialmente en países como Estados Unidos, Rusia, Francia y otros más. Y muchos serotipos se siguen probando a nivel laboratorio para probar su eficiencia.

En México, recientemente se aislaron de suelo algunas cepas de B. thuringiensis, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León; por lo que se considera relevante probar estas cepas con plagas de importancia económica, destacando entre algunas por su daño Heliothis virescens.

Este insecto es una plaga presente en la mayor parte del planeta atacando a un sinnúmero de cultivos, entre los cuales se encuentra: algodón, tabaco, tomate, cacahuate, soya, sandía, melón, pepino, alfalfa y otros.

Este insecto ha sido una plaga de difícil control con los métodos tradicionales, incluso, en algunos cultivos, el uso

de productos químicos para controlar otras plagas importantes, han favorecido que al través de varios años de aplicaciones haya pasado de ser una plaga secundaria, a ser una plaga prima ria más dañina aún que sus competidores.

En México, H. virescens, se le invierten cantidades consi derables de dinero anualmente para lograr su control, agravándose esto, con las grandes pérdidas que se tienen por el daño que ocasiona en los cultivos que ataca.

El presente trabajo se trazó con el objetivo de probar la toxicidad de los extractos, GM-1, GM-2, GM-7....., GM-19 de B. thuringiensis contra larvas de primer instar de H. virescens a nivel de laboratorio; evaluándose la toxicidad en porcentajes de larvas muertas, reducción de crecimiento y disminución en peso.

2. LITERATURA REVISADA

2.1. Control microbiológico de insectos.

2.1.1. Antecedentes.- El control microbiológico de insectos o control microbial, se puede definir como la supresión de poblaciones perjudiciales de insectos mediante microorganismos, pudiendo ser natural o ejercida por el hombre. N.A.S. (1978).

La patología de insectos desde hace tiempo, se ha preocupado por el control de insectos dañinos, principalmente con microorganismos capaces de persistir en una etapa latente fuera del insecto. Oginsky y Umbreit, 1954; citados por Heimpel y Angus (1963).

Aunque la mayor parte de las investigaciones sobre entomopatógenos ha concentrado su interés en aquellos cuyas propiedades permitan su desarrollo hasta productos comerciales competentes con insecticidas químicos, el control microbial comprende el uso de microorganismos de acuerdo con sus atributos específicos. Hall, (1963); Ignoffo y Anderson (1979).

Las observaciones de enfermedades en la abeja Apis mellifera L. y el gusano de seda Bombyx mori L. provienen de China y Grecia desde el año 2,700 A.C., sin embargo, el primer enfo-

que científico de una enfermedad en insectos, fue la investigación de la "uva blanca", enfermedad del gusano de seda conocida en Italia como "calcino" causada por el hongo Beauveria bassiana Bals. Los famosos trabajos de Pasteur acerca de la "pebrina", enfermedad del gusano de seda causada por Nosema bombycis Nageli, son también conocidos.

La idea de utilizar agentes microbianos para el control de insectos se concibió originalmente en el siglo XVIII. La producción masiva de Metarrhizium anisopliae (Metch.) se efectuó en un intento por contrarrestar el gorgojo de la remolacha azucarera Cleonus punctiventus Germ. N.A.S. (1978).

En Europa, a fines del siglo XIX, se intentó usar hongos para controlar especies de insectos. Casi al mismo tiempo, en Estados Unidos se empleaba el hongo Beauveria globulifera (Speg.) para intentar controlar a la chinche Blissus leucopterus (Say.). Sin embargo, la mayoría de estos esfuerzos terminaron en fracasos totales o parciales debido a fallas en el control del medio ambiente y a los escasos conocimientos sobre las especies que se estaban utilizando.

Los primeros intentos en forma, se realizaron en Canadá, Francia y Hungría entre 1925 y 1930, con el objeto de controlar al barrenador europeo del maíz Ostrinia nubilalis (Hubner)

mediante agentes microbianos. Sin embargo, no tuvo grandes alcances. N.A.S. (1978).

En Francia, durante los años de 1930 y 1940, apareció una formulación comercial recomendada como insecticida a base de esporas de una bacteria reportada por Mattes en 1927 como altamente patogénica. Esta cepa es considerada hoy, como el reaislamiento de la cepa descubierta por Berliner en 1911, a la que nombró Bacillus thuringiensis. Heimpel y Angus (1963); Hall (1963).

Según muchos autores, los trabajos realizados por Dutky y White de 1940 a 1950 fueron el primer programa en forma de control microbial; trabajando en la reproducción de Bacillus popilliae Dutky, causante de la enfermedad lechosa del tipo "A" del escarabajo japonés Popilliae japonica (Neum.), en donde obtuvieron un gran éxito al hacer liberaciones de campo. Hannay (1953); Heimpel y Angus (1963); Steinhaus (1957); Jacobs y Gerstein (1960).

2.1.2. Importancia del control microbiológico de insectos.- Actualmente, han sido encontrados alrededor de 1165 microorganismos relacionados con insectos; casi todos son patógenos. Quedando comprendidas 90 especies y variedades de bac

terias, 260 especies de virus y de rickettsias, 460 especies de hongos, 255 especies de protozoarios y 100 especies de nemátodos. N.A.S. (1978).

Uno de los factores que impulsan a la utilización de los entomopatógenos como agentes controladores es, que la mayoría de los microorganismos capaces de provocar enfermedades en los insectos no daña a otros animales o a las plantas. De Bach (1974).

Es importante mencionar algunas de las ventajas que ofrece el control microbial:

- El alto grado de especificidad de la mayoría de los patógenos.
- La compatibilidad de los patógenos con insecticidas, hasta el grado de que los dos pueden ser usados en forma conjunta y, cuando menos en algunos casos, en forma sinergista.
- La facilidad y bajo costo con que algunos patógenos pueden ser producidos.
- La gran versatilidad de los patógenos microbiales en lo que se refiere a los métodos de aplicación.
- La lentitud mediante la cual el hospedero susceptible

desarrolla resistencia a un patógeno microbial. De Bach, (1974).

2.1.2.1. Algunos agentes de control microbial.- Aunque existen, como ya se mencionó anteriormente, un gran número de microorganismos patógenos de insectos, sólo se incluirán algunos de los más utilizados y que han demostrado su efectividad patogénica.

Entre los virus destacan: los virus de la polihedrosis nuclear donde se encuentran los virus Heliothis, Lymantria, Orgya, Pieris, Spodoptera, entre otros; y los virus de la polihedrosis citoplasmática, como el virus Dendrolimus.

En cuanto a los protozoarios, se pueden mencionar: Nosema locustae, N. algerae, Mattesia trogodermae, y Vairimorphaneatrix.

Los hongos principales patógenos de insectos son: Aschersonia aleyrodis, Beauveria bassiana, Hirsutella thompsonii, Metarrhizium anisopliae, y otros.

Entre las bacterias más importantes se citan: Bacillus moritai, B. popilliae, B. thuringiensis, principalmente. Igoffo y Anderson (1979).

Las rickettsias patógenas de insectos no han sido utili-

zadas para pruebas de patogenicidad debido a su alta inespecificidad y dificultad de manejo por ser parásitos obligados. Finney (1981).

2.1.3. Generalidades del control microbiológico de insectos en México.- El control microbiológico de insectos en México es aún muy joven. Las investigaciones relacionadas con este campo han sido aisladas y muy poco difundidas. Sin embargo, algunos de estos trabajos han sido importantes.

En 1911, D'Herelle, investigador francés encontró una bacteria la cual infectaba en forma natural, poblaciones de Schistocerca spp en el Estado de Yucatán, habiendo poca difusión de este trabajo en México, no así en Francia. Steinhaus (1974).

De esa fecha hasta 1976, no es fácil encontrar trabajos que se relacionen con el control microbial. En este año, Ramos (1976) aisla tres extractos de Metarrhizium anisopliae (Metch.) y observó mortalidades del 100% en larvas de tercer instar de Heliothis virescens (Fabricius).

Posteriormente, empiezan a hacerse investigaciones con algunas bacterias entomopatógenas. Cisneros en 1980 y Flores en 1981 trabajaron con algunas formulaciones comerciales de

Bacillus thuringiensis Berliner en contra de Heliothis zea (Boddie) y Pieris rapae L. observando baja mortalidad.

Galan, et al. en 1980, aislaron de muestras de suelo de varias regiones de la República Mexicana, 19 cepas de B. thuringiensis en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. (Galan, 1983; comunicación personal.).

Núñez (1980) encuentra mortalidad del 100% en larvas de primer instar de Spodoptera frugiperda (Smith) utilizando la cepa GM-1 de B. thuringiensis, uno de los aislamientos anteriores. Maldonado (1981) trabajando con los mismos organismos determina la potencia de la cepa GM-1 en unidades internacionales U.I.

Ochoa (1983) trabajando con seis diferentes medios de fermentación de la cepa GM-1 de B. thuringiensis encontró un promedio de mortalidad de 51.7% con una dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$ de dieta en larvas de Spodoptera frugiperda.

Murga (1983) trabajando con la cepa GM-2 de B. thuringiensis en diferentes medios de cultivo obtiene mortalidades de 4 a 32% en larvas de H. virescens y Trichoplusia ni (Hubner).

2.2. Bacillus thuringiensis en el control microbiológico de insectos.

2.2.1. Descubrimiento de B. thuringiensis.- El término B. thuringiensis encierra a un amplio grupo de bacterias esporulantes, caracterizadas sin fundamento como las bacterias "cristalíferas". Ellas comparten algunas características comunes: primero, el tamaño de sus células, la forma y colocación de sus esporas, que es muy parecida a B. cereus un organismo común del suelo; segundo, las células esporuladas de todos los cultivos normales de B. thuringiensis contienen uno o más cuerpos parasporales cristalinos, generalmente en forma de diamante, de ahí el nombre de "cristalíferas", aunque no siempre tienen esta forma. Dulmage, et al., (1981)

El descubrimiento de B. thuringiensis se acredita a Ishiwata, quién describió una severa "flachería" o "enfermedad sotto", aislando también a los organismos causales -"sotto" es una palabra japonesa que significa "flácido", la condición típica de los insectos con esta enfermedad- siendo su identificación incompleta, y la primera descripción válida microbiológicamente de B. thuringiensis fue hecha en Alemania por Berliner, quién aisló el bacilo en 1911, de larvas enfermas de Anagasta kuehniella. En 1915, Berliner identificó

aislamientos como una nueva especie y propuso el nombre de B. thuringiensis en honor a la provincia de Thuringen, en la cual había sido descubierto. También en 1915; empero, subsecuente a la publicación de Berliner, Oaki y Chigasaki en Japón, publicaron una detallada descripción del organismo de Ishiwata y propusieron el nombre de B. sotto.

Mientras que en Japón, B. sotto era visto como un posible organismo dañino para las colonias de gusanos de seda B. thuringiensis, el cual probó ser virulento para muchas otras especies de insectos, fue tomado en Europa como un instrumento potencial para el control de las plagas de insectos. Se esperaba, que la liberación de esta bacteria en áreas infestadas por insectos dañinos pudieran iniciar epidemias, que redujeron las poblaciones de insectos lo suficiente, para que no pudieran causar daños económicos. Sin embargo, las primeras pruebas tuvieron poco éxito y el interés se perdió, hasta que Mattes en 1927 reaisló el organismo encontrado por Berliner y revivió el concepto del uso de B. thuringiensis para el control de insectos. Las cepas de Mattes fueron eventualmente adoptadas en Francia, para producción de formulaciones comerciales de B. thuringiensis. Dulmage y Aizawa, (1982).

2.2.2. Descripción de Bacillus thuringiensis.- En este punto se tratará de dar la descripción, posición taxonómica, así como características generales, específicas y subespecíficas de B. thuringiensis.

2.2.2.1. Posición taxonómica.- Existieron controversias para establecer la especie B. thuringiensis como una especie aparte de B. cereus; sin embargo, el concenso entre bacteriólogos y entomólogos, apoya el uso de especies separadas para el grupo de "esporíferas" y "cristalíferas". Heimpel y Angus (1963).

Toumanoff y Vago en 1951, aislaron un patógeno formador de esporas de larvas enfermas del gusano de seda Bombyx mori, y les llamó la atención el parecido con el B. sotto de Ishiwata y B. thuringiensis de Berliner. Ellos llamaron a su aislamiento B. cereus var. alesti. Heimpel y Angus (1963).

Toumanoff sugiere en 1952, que los cultivos aislados por Vago y él, por Berliner e Ishiwata, fueran todos variantes de B. cereus. Dulmage y Aizawa (1982).

En los años subsiguientes, el concenso creció y todos estos bacilos fueron relacionados. Tenían los tres, el mismo tamaño y forma, contenían un cuerpo parasporal cristalino den-

tro de la célula; sin embargo, existían diferencias taxonómicas entre ellos, y no hubo concordancia en que si debieran ser considerados como especies individuales. Heimpel y Angus en 1958 y 1959, sugirieron que estos aislamientos tenían diferencias taxonómicas con B. cereus, y no podían ser considerados como variedades de este y, propusieron que se tomará a B. thuringiensis como especie nueva, y los aislamientos existentes como variedades de ésta; de tal forma, que el aislamiento realizado por Ishiwata sería B. thuringiensis var. sotto y el de Toumanoff y Vago, B. thuringiensis var. alesti. Esta clasificación es válida todavía. Dulmage y Aizawa (1982).

La ubicación taxonómica de B. thuringiensis es la siguiente. Buchanan y Gibbons (1974).

Reino:	Procariote
División II:	Procariotes indiferente a la luz
Clase I:	Bacterias. Partes 2-17
Parte 15:	Bacilos y cocos formadores de endosporas
Orden I:	Eubacteriales
Suborden I:	Eubacteriineae
Familia I:	Bacillaceae
Género I:	<u>Bacillus</u> (Cohn, 1872)
Especie:	<u>thuringiensis</u> (Berliner, 1911)

2.2.2.2. Características del género Bacillus. Las especies de este género son aeróbicas o anaeróbicas facultativos.

Estos microorganismos tienen forma de bastón, algunas veces en cadena, capaces de producir endosporas. Los esporangios son como células vegetativas, excepto en algunas especies en las cuales la espora tiene un diámetro mayor que la célula y causa un abultamiento.

El tamaño de las células varía de 0.3 a 2.2 μ de ancho, y de 1.2 a 7.0 μ de longitud, son móviles con flagelos peritricos y generalmente gram-positivas.

La mayoría de las especies de Bacillus atacan a una amplia variedad de sustratos por medio de enzimas, las cuales son excretadas dentro de materia circundante. La función de estas enzimas es reducir los compuestos más complejos a condiciones solubles o por lo menos más asimilables, que pasen a través de la pared celular. Heimpel y Angus (1963).

2.2.2.3. Características específicas de Bacillus thuringiensis.- Es un bacilo gram-positivo de aproximadamente 1.0 a 1.2 μ de ancho y de 3.0 a 5.2 μ de longitud, con esporas ovales o cilíndricas de pared delgada, con esporangios no hinchados. Forma una proteína cristalina durante la esporulación

denominada cuerpo parasporal, que queda depositada dentro del esporangio, pero, en el exterior de la spora. Este cristal de proteína es una estructura de forma comúnmente bipiramidal, esta compuesta por una proteína pura y su actividad biológica es destruida por altas temperaturas, es insoluble en agua; pero, se disuelve en sustancias alcalinas. Brock (1973).

2.2.2.4. Variedad de Bacillus thuringiensis.- Heimpel y Angus en 1958 y 1959, propusieron en sus escritos, la utilización de pruebas bioquímicas para la identificación de las variedades de B. thuringiensis. Esta clasificación fue usada por varios años, hasta que Bonnefoi y De Barjac en 1963. De Barjac y Bonnefoi en 1968, reportaron que la identificación de variedades podía ser distinguida serológicamente, por la comparación de antígenos para sus proteínas flagelares. Los antígenos flagelares, ahora llamados antígenos H, probaron ser características muy reproducibles y son ahora muy utilizados para la identificación de variedades.

Norris en 1964; Norris y Burges en 1965, propusieron que los patrones electroforéticos de las esterasas producidas en células vegetativas de B. thuringiensis, podrían ser usados también para distinguir variedades de este organismo. Hubo una relación significativa entre la clasificación hecha por anti-

genos H y por el análisis de esterases. Los análisis de los patrones de esterasa son ahora usados para suplementar los procedimientos de serotipificación desarrollada por De Barjac Dulmage y Aizawa (1982).

Las variedades de B. thuringiensis, los nombres de sus descubridores y el insecto del cual fueron aisladas se presentan en la tabla 1.

2.2.3. Modo de acción de Bacillus thuringiensis.- Ha sido demostrado que la susceptibilidad a B. thuringiensis varía entre las especies de insectos, y que la respuesta de una especie en particular es modificada por factores tales como la edad, vigor y concurrencia de la infección con otros microorganismos; además, la variabilidad es influenciada por factores ambientales como: humedad, temperatura y fuente de alimento y, en algunos casos, por el método de dosificación. Finalmente, la patogenicidad de la bacteria es afectada dependiendo de la variedad, edad del cultivo, proporción de esporas y cristales, condiciones del cultivo y el medio de fermentación utilizado. Heimpel y Angus (1963); Ochoa (1983).

El modo de acción de B. thuringiensis pudiera generalizarse en dos formas: parálisis general y parálisis intestinal.

TABLA 1. Historia de los descubrimientos de las variedades de Bacillus thuringiensis.

VARIEDAD	DESCUBRIDOR	FUENTE	LOCALIZACION	AÑO	REFERENCIAS
aizawai	Aizawa	Granja sericícola	Japón	1961	Bonnefoi y De Barjac, 1963
alesti	Toumanoff y Vago	<u>Bombyx mori</u>	Francia	1951	Toumanoff y Vago, 1951
canadensis	Morris	<u>Acronicta grisea</u>	Canadá	1972	De Barjac y Bonnefoi, 1972
dakota	De Lucca y Larson	<u>Aislado del suelo</u>	U.S.A.	1978	De Lucca et al., 1979
darmstadiensis	Kreig	<u>Galleria mellonella</u>	Alemania	1961	Kreig et al., 1968
dendrolimus	Talalae	<u>Dendrolimus sibiricus</u>	Rusia	1956	Talalae, 1956
entonomocidus	Steinhaus	<u>Aphomia gularis</u>	U.S.A.	1950	Steinhaus, 1951
finitimus	Mac Namee	<u>Malacosoma disstria</u>	Canadá	1956	Heimpel y Angus, 1958
galleriae	Isakova	<u>Galleria mellonella</u>	Rusia	1956	Isakova, 1958
indiana	De Lucca y Larson	<u>Aislado del suelo</u>	U.S.A.	1978	De Lucca et al., 1979
israelensis	Goldberg y Margalit	<u>Culex spp.</u>	Israel	1977	De Barjac, 1978
kenyae	Norris y Burges	<u>Ephestia cautella</u> ¹	Inglaterra	1961	Norris y Burges, 1963
kurstaki	Kurstak	<u>Anagasta kuehniella</u>	Francia	1962	Kurstak, 1962
kurstaki, HD-1	Dulmage	<u>Pectinophora gossypiella</u>	U.S.A.	1967	Dulmage, 1970
kyushuensis	Ohba y Aizawa	<u>Granja sericícola</u>	Japón	1979	Ohba y Aizawa, 1979
morrisoni	Norris	<u>Anagasta spp.</u> ¹	Escocia	1963	Norris, 1964
ostrinae	Ren, et al.	<u>Ostrinia nubilalis</u>	China	1975	Ren, et al., 1975
pakistanii	Shaikh	<u>Laspeyresia pomonella</u>	Pakistán	1975	De Barjac et al., 1977
sotto	Ishiwata	<u>Bombyx mori</u>	Japón	1901	Ishiwata, 1901
subtoxicus	Steinhaus	<u>Plodia interpunctella</u>	U.S.A.	1945	Heimpel y Angus, 1958
thuringiensis	Berliner	<u>Anagasta kuehniella</u> ¹	Alemania	1911	Berliner, 1911
thuringiensis	(raza de Mattes)	<u>Anagasta kuehniella</u> ¹	Alemania	1927	Mattes, 1927
thompsoni	Thompson	<u>Galleria mellonella</u>	U.S.A.	1969	De Barjac y Thompsoni, 1970
tolworthi	Norris	<u>Plodia spp.</u>	Inglaterra	1963	Norris, 1964
toumanoffi	Toumanoff	<u>Galleria mellonella</u>	Francia	1956	Kreig, 1969
wuhanensis	Hubei Institute	<u>Anomis flava</u>	China	1976	Hubei Inst. of Microb., 1977
galanensis*	Galan et al.	<u>Aislado de suelo</u>	México	1984	J. of Inver. Pathol., 1984

Fuente: E. Kurstak, 1982

1. Anagasta = Ephestia

* Fuente: Journal of Invertebrate Pathology.

2.2.3.1. Parálisis general.- El desarrollo de esta parálisis ocurre rápido, después de la ingestión de los cristales. Después de este momento, la larva se considera moribunda, aunque el tiempo de la muerte sea un poco más difícil de determinar.

Al mismo tiempo que ocurre la parálisis, la hemolinfa del insecto se torna progresivamente más alcalina, se piensa que esto ocurre porque la proteína del cristal actúa en el intestino medio, alterando la permeabilidad, habiendo un equilibrio entre los contenidos del intestino medio que son de un pH alto de 10.2 a 10.5, y la hemolinfa que tiene un pH de 6.8. Esto pudiera indicar que la parálisis general es producida probablemente por el aumento en la alcalinidad de la hemolinfa y no por una acción directa de la toxina. Heimpel y Angus (1959); Heimpel y Angus (1963); Angus (1962).

2.2.3.2. Parálisis intestinal.- Este tipo de parálisis ha sido observado en una amplia variedad de lepidópteros infectados con B. thuringiensis. Se observa inactividad, cese de la alimentación, disentería y regurgitación; sin embargo, no ocurre una parálisis general rápida y no hay un incremento significativo en el pH de la hemolinfa. Es notable, que las larvas no se alimenten posteriormente a la ingestión de espo-

ras y cristales, y se ha demostrado mediante rayos X que el intestino de las larvas deja de funcionar. Después de esto, la muerte ocurre entre las siguientes 24 a 48 horas. Heimpel y Angus (1959); Heimpel y Angus (1963); Angus (1962).

2.2.4. Toxinas de Bacillus thuringiensis.- La investigación del modo de actuar de B. thuringiensis ha demostrado que esta bacteria produce, al menos, cuatro sustancias tóxicas para los insectos: fosfolipasa C o α -exotoxina; una fosfolipasa no identificada o "factor-Mallophaga"; β - exotoxina y δ - endotoxina. Dulmage y Aizawa (1982).

De estas toxinas solo dos son significativas en las formulaciones comerciales de B. thuringiensis: β - exotoxina y δ - endotoxina.

Se hará una breve descripción de cada una de las toxinas, con un mayor énfasis en estas dos últimas.

Fosfolipasa C o α - exotoxina.- Es una enzima identificada por Toumanoff en 1953, la cual es producida por la célula bacteriana en desarrollo y destruye los fosfolípidos esenciales en las células de los insectos, ha sido poco estudiada, aún a pesar de que ha demostrado su toxicidad en ciertos insectos. Lysenko y Kucera (1971).

Factor Mallóphaga.- Es una fosfolipasa no identificada de características químicas y toxicológicas desconocidas. Ha sido probada en su acción en contra de piojos masticadores de algunos mamíferos, produciendo altas mortalidades. Dulmage, et al. (1981).

β - Exotoxina.- Es producida por algunas razas de B. thuringiensis. Es una toxina soluble en agua y estable al calor, razón por la que se le ha denominado como la "toxina termoes- table", también como "factor - mosquito" y posteriormente β -exotoxina.

La toxina ha sido purificada e identificada como un nucleótido de adenina. Tiene una toxicidad generalizada para insectos y mamíferos. De significancia particular, es la actividad teratológica demostrada en insectos maduros. A causa de estos efectos, ha sido prohibido en cualquier formulación comercial de B. thuringiensis en los Estados Unidos. Es tóxica a mamífero por inyección, es pobremente absorbida a través del intestino de los mismos y tiene una toxicidad oral relativamente baja, Dulmage y Aizawa (1982).

\int - Endotoxina.- Es el principio activo de las formulaciones comerciales de B. thuringiensis, sólo o en combinación con la spora. Su descubrimiento es relativamente reciente.

Hannay postuló en 1953 que el cristal o cuerpo parasporal estaba asociado con la actividad insecticida de este organismo. En 1967, Heimpel propuso que esta toxina fuera llamada δ -endotoxina. Es una proteína o polipéptido que está asociada con, o es parte del cristal que puede ser visto en las células esporuladas de B. thuringiensis; sin embargo, su actividad no ha sido definida químicamente. Esta endotoxina es insoluble en agua, pero es soluble en soluciones alcalinas. Al ser ingerida por el insecto ocurre una parálisis rápida del intestino, con cambios en el pH del mismo y desarrolla una toxemia general. Dulmage y Aizawa (1982).

2.2.5. El cristal parasporal de Bacillus thuringiensis.- El cristal parasporal es un compuesto protéinico, insoluble en agua. La masa de el cristal representa poco más del 30% del peso seco del esporangio maduro, su peso molecular fue calculado en 23×10^4 daltons. Es una estructura o agregado bipyramidal normalmente, aunque existen otras formas con moléculas polipeptídicas en forma elipsoidal. No es inactivado a temperaturas de 80°C por 20 minutos, ni por exposiciones superiores a una hora a la acción directa de los rayos solares; sin embargo, la toxina solubilizada es desnaturalizada por el calor. Norris (1971); Fast (1981); Prasad y Shethna (1967).

2.2.6. Ecología de Bacillus thuringiensis.- Es comúnmente encontrado en insectos; pero, casi nunca causa epizootias en la naturaleza. Es un organismo que puede subsistir en ambientes distintos; aunque, se le ha encontrado con mayor frecuencia en suelos cercanos a granjas sericícolas. La distribución de B. thuringiensis en la naturaleza ha sido poco estudiada y es poco conocida. Se podría esperar encontrarlo en diversos medios, no obstante su distribución parece estar restringida; más, no ha habido nunca un verdadero esfuerzo para determinar la distribución normal del organismo.

De Lucca, et al. en 1981, analizaron suelos para determinar la presencia de B. thuringiensis. Ellos encontraron al género Bacillus en 16% de los suelos examinados; pero, de 32,107 aislamientos de Bacillus, solamente el 0.75% fueron de la especie thuringiensis. Cinco diferentes variedades fueron encontradas en sus análisis: galleriae, kurstaki, darmstadensis, más dos nuevas variedades: indiana y dakota, no conocidas previamente. Este análisis pudiera indicar que B. thuringiensis constituye una pequeña fracción en el complejo microbial del suelo; más, no indica que no sea común. Dulmage y Aizawa (1982).

Normalmente, cuando se hacen aplicaciones de formulacio-

nes de B. thuringiensis, se usan mezclas de esporas viables y δ - endotoxina. El ingrediente activo principal es, por supuesto, la δ - endotoxina, no obstante, al hacerse estudios de la persistencia de estas formulaciones, se utiliza como criterio el conteo de esporas. Esto pudiera llevar a información no exacta, cuando se pretende evaluar el esquema de tratamiento. Dulmage y Aizawa (1982).

Numerosos reportes han mostrado que las esporas de B. thuringiensis son susceptibles a la acción germicida de la luz solar. Cantwell y Franklin (1966).

En estudios de largo plazo, es a veces imposible separar el clima y la luz del sol como las causas de la pérdida de esporas viables. Norris y Hildebrand reportaron en 1974, que había una reducción del 93% en la viabilidad de las esporas después de 48 horas de exposición directa a los rayos solares; sin embargo, estos mismos autores reportaron actividad insecticida residual contra Choristoneura fumiferana 42 días después de la aspersión.

Las esporas de B. thuringiensis pueden persistir por un tiempo considerable en el suelo; aunque, el número de las mismas va reduciéndose paulatinamente. Dulmage y Aizawa (1982).

2.2.7. Bioensayos con Bacillus thuringiensis.- La única forma de que la cantidad de toxina presente en una mezcla pueda ser medida, es a través del bioensayo. Ya que las proteínas que producen la δ - endotoxina no tienen características inusuales. Dulmage (1981).

Los bioensayos con insectos son difíciles de llevar a cabo, y los primeros investigadores intentaron evitarlos. Como el exámen microscópico de B. thuringiensis mostraba un cristal de la δ - endotoxina por cada espora del bacilo, se esperaba que un conteo de esporas viables presentes en una preparación, podrían ser usadas para determinar su actividad insecticida. Este método pronto se generalizó en su uso para medir la potencia de las formulaciones de B. thuringiensis. Dulmage et al. (1976).

Bonnefoi, et al. (1958) fueron los primeros en no estar de acuerdo con el conteo de esporas, y señalaron que la medición de la potencia de los extractos de B. thuringiensis debía ser en base a un bioensayo, comparando las respuestas contra un estándar de referencia.

Casi al mismo tiempo, Burgerjon reportó que la mortalidad ocasionada por B. thuringiensis es inversamente proporcional al área de las hojas ingeridas por los insectos. Esta

área se medía por medio de una celdilla fotoeléctrica, y utilizaba a Pieris brassicae como insecto de prueba. Burges y Thompson (1971).

Posteriormente, Splittstoesser y Mc Ewen (1961) sugirieron que podrían mejorarse los bioensayos de δ - endotoxina, si ésta fuera administrada a los insectos de prueba, incorporándola a una dieta artificial. No obstante, el conteo de esporas siguió siendo utilizado para estandarizar las formulaciones de B. thuringiensis.

En 1966, se realizó un simposio sobre la estandarización de los agentes microbiales en Wegeniengen, en los Países Bajos, proponiéndose en el mismo, que la formulación de un complejo de la δ -endotoxina de B. thuringiensis, preparado por el Instituto Pasteur de Francia y nombrado E-61, fuera adoptado como la principal referencia estándar internacional. Así mismo, se le asignó una potencia de 1000 unidades internacionales (UI/mg), recomendándose posteriormente, que todas las preparaciones de δ - endotoxina de B. thuringiensis fueran comparadas en su potencia, directa o indirectamente con la E-61 y, que ésta fuera expresada en UI. Burges, 1967; citado por Dulmage et al. (1976).

Aunque, el expresar las potencias de los aislamientos de

§ - endotoxina de B. thuringiensis fue un avance muy necesario, el estándar propuesto no tuvo una aceptación generalizada, hasta que Dulmage (1970), descubre un nuevo aislado de B. thuringiensis al que denomina HD-1, el cual no fue muy alto en el conteo de esporas que las preparaciones previas de § - endotoxina; pero, fue muchas veces más potente, y esto fue demostrado en pruebas de campo y laboratorio. De esta forma, el conteo de esporas obviamente no fue válido y la necesidad del bioensayo quedó demostrada.

Posteriormente, Dulmage et al. en 1971, proponen un bioensayo basado en larvas de Trichoplusia ni, el cual fue adoptado por Estados Unidos, como el bioensayo oficial para medir la potencia de las formulaciones de B. thuringiensis que estaban siendo comercializadas, y una formulación de HD-1 de B. thuringiensis, etiquetada HD-1-S-1971, fue adoptada como la referencia estándar primaria para usarse en los bioensayos, a la cual se le asignó una potencia de 18,000 UI/mg.

2.2.8. Insectos susceptibles a Bacillus thuringiensis.- Continuamente se incrementa el número de insectos susceptibles a las toxinas de las bacterias cristalíferas. La mayoría de estas especies corresponden al orden lepidóptera; sin embargo, se ha encontrado susceptibilidad en insectos de los

ordenes hymenóptera, díptera y coleóptera. De Bach (1974).

B. thuringiensis y sus variedades han sido probadas sucesivamente contra más de 137 especies de insecto. Burges y Thomson (1971).

Entre los lepidópteros más comúnmente utilizados para probar la patogenicidad de B. thuringiensis se encuentran: Trichoplusia ni (Hubner); Heliothis virescens (Fabricius), H. zea (Boddie), Manduca sexta (Johanssen), Pieris brassicae L., Pyrausta nubilalis (H.), Gelechia gossypiella (Saunders) Prodenia litura (F.). Estas y otras especies han sido probadas en países como: Alemania, Estados Unidos, Francia, Rusia y otros. Krieg (1981).

Así mismo, han sido utilizadas diversas especies de los géneros: Culex, Aedes, Anopheles, Chironomus, Diamesa, Simulium y otros correspondientes al orden díptera, en los cuales se ha encontrado una gran susceptibilidad a diferentes aislamientos de B. thuringiensis. Ignoffo et al. (1981).

2.2.9. Estudios de la actividad de Bacillus thuringiensis. Han sido en realidad, varios estudios los que se han hecho, sobre la actividad de B. thuringiensis y sus variedades.

B. thuringiensis fue utilizado para control experimental

de el barrenador europeo del maíz, Ostrinia nubilalis (H.), entre 1920 y 1930 y fue publicado en varios escritos. La bacteria fue probada en campo contra Gellechia gossypiella (S.) Prodenia litura (F.), Sparganotis pilleriana (Schifferrmuller) Clysia ambiguella (H.), Ephestia elutella(H.) y Pieris spp., entre los años de 1930 y 1940. Esto aumentó el interés sobre B. thuringiensis y su actividad para especies de lepidópteros.

Jacobs reportó en 1950, la aparición en el mercado francés de un producto llamado "sporeine", el cual contenía esporas de B. thuringiensis var. thuringiensis, recomendado para el control de Anagasta kuehniella (Zeller.). Steinhaus en 1951, observó que en pruebas de campo con cultivos esporulados de B. thuringiensis, se obtenían resultados muy satisfactorios contra larvas de Colias eurytheme (B.). Heimpel y Angus (1963).

Posteriormente, Hall (1958) en pruebas de laboratorio muestra la susceptibilidad de varias especies de insectos a la acción de B. thuringiensis, encontrando alta mortalidad en Amorbia essigana (Busck), Estigmene acrea (Drury), Baculatrix thurberiella (Busck), Udea rubigalis (Guen), Heliothis zea, y mortalidades moderadas en Trichoplusia ni, Laphygma exigua (= Spodoptera) (Smith) y Platynota stultana (Wlshn).

Ignoffo et al., (1981) reportan que las especies Aedes

aegyptii L. y Culex quinquefasciatus (Say) presentaban gran susceptibilidad a las toxinas de B. thuringiensis var. israelensis y un poco menos susceptibles a la var. kurstaki.

Bull et al., (1979) utilizando B. thuringiensis en pruebas de campo, junto con un virus de la polihedrosis nuclear y liberaciones de Trichogramma pretiosum (Riley) en contra de insectos perjudiciales del algodón, logran reducir significativamente el número de éstos y el daño causado.

Pruebas de este tipo y de otros han sido realizados a través de los años, y aún continúan realizándose, con resultados cada vez más satisfactorios.

2.3. Generalidades sobre Heliothis virescens.

2.3.1. Importancia, daños, hospederos y distribución de H. virescens.- Es un insecto cosmopolita, plaga importante en una amplia variedad de cultivos, posee una gran voracidad y es causante de grandes pérdidas en la agricultura.

Se alimentan de las hojas, brotes tiernos, yemas terminales, capullos florales, frutos y granos de sus hospederos. Este daño es causado en el estado larval. Akehurst (1973).

Entre los principales hospederos de H. virescens se en-

cuentran: tabaco, algodón, soya, jitomate, cártamo, garbanzo, melón, sandía, pepino, entre otros, y de ornato: geranio y agerato. Metcalf y Flint, (1980).

Se encuentra distribuido en todo México; catalogado como plaga primaria, originando grandes pérdidas en la producción nacional, siendo difícil de combatir (Núñez, comunicación personal).

2.3.2. Posición taxonómica y descripción morfológica.- La posición taxonómica de H. virescens, está bien definida y es como sigue. Borrór, Delong y Triplehorn (1976).

Phyllum	:	Arthropoda
Subphyllum	:	Mandibulata
Clase	:	Insecta
Subclase	:	Pterygota
División	:	Endopterygota
Orden	:	Lepidóptera
Suborden	:	Frenatae
División	:	Macrolepidóptera
Superfamilia	:	Noctuoidae
Familia	:	Noctuidae
Género	:	<u>Heliothis</u>
Especie	:	<u>virescens</u>

2.3.2.1. Características de la familia Noctuidae.- Es la familia más numerosa de los lepidópteros y muchos de ellos son plagas de plantas cultivadas. Los adultos miden entre 2.5 y 5.0 cm de punta a punta de las alas, en promedio. Generalmente, de colores café o gris opaco. El cuerpo es robusto, son de hábitos nocturnos y fuertemente atraídos por la luz. Las antenas son filiformes generalmente. Los adultos poseen proboscis. Las larvas son poco atractivas, cilíndricas y de tamaño moderado, de color verde, café o gris opaco, manchadas o rayadas de negro, longitudinalmente; son lisas o ligeramente cubiertas de pelos. Metcalf y Flint (1980).

2.3.2.2. Características específicas de Heliothis virescens.- El adulto de H. virescens es una palomilla de aproximadamente 2.0 - 2.5 cm de longitud y de 3.0 - 3.5 cm de extensión alar, las alas anteriores son de color verde pálido y están cruzadas por cuatro bandas oscuras y oblicuas. Bates y Osborn (1958).

Una sola hembra puede depositar hasta 3,000 huevecillos, aunque Núñez en 1984, señala de 300 a 500 huevecillos por hembra. Los huevecillos son de aproximadamente 0.5 - 1.0 mm de diámetro, aplanados y con estrias a partir de una depresión central, de color blanco cremoso. Las larvas son de color verde pálido, recién incubadas tienen una longitud de 1.0 - 1.2

mm, y completamente desarrolladas pueden medir hasta 4.0 cm. El cuerpo de la larva está marcado longitudinalmente por dos rayas negras, separadas entre sí, por una línea delgada clara de color amarillento o blanco sucio. Metcalf y Flint, (1980).

Las larvas pueden identificarse de otros noctuidos por poseer en el tercer segmento torácico, 4 pináculos simétricos y prominentes en la región dorsal, y un pináculo a cada lado de los anteriores en la región dorsopleural. Además, se diferencia de H. zea en el tercer instar larval por poseer un retináculo en la cara interna de las mandíbulas (Núñez, comunicación personal).

La pupa tiene un color café rojizo obscuro y mide aproximadamente 1.8 cm de longitud. Bates y Osborn (1958).

2.3.3. Ciclo biológico y hábitos de Heliothis virescens.- El tiempo que requiere una generación de H. virescens desde huevecillo hasta adulto es de 30 - 40 días. Los adultos de este insecto son voladores fuertes y bajo alguna circunstancia pueden migrar hasta más de cien kilómetros. La vida de los adultos puede variar desde 6 hasta 14 días. Las hembras depositan sus huevecillos en forma aislada, por la noche, en varias partes de la planta, aunque el envés de las hojas es

uno de los sitios más preferidos para la oviposición. Los huevecillos eclosionan de 2 - 7 días después, emergiendo las pequeñas larvas que pasan por 6 instares larvales antes de entrar a la pupación. El estado larval se lleva a cabo en 15-21 días en lugares con climas cálidos. Una vez que la larva ya completó su desarrollo, baja al suelo, en donde pupa en forma de huso y sin cocón protector, generalmente, entre las primeras capas del suelo, a 2.0 cm de la superficie. En este estado pasa de 7 - 10 días en lugares de clima cálido, emergiendo los adultos. Akehurst (1984); Bates y Osborn (1958).

2.3.4. Métodos de control de Heliothis virescens.- Entre las medidas de control más recomendadas se encuentran las prácticas culturales. El adelanto de las fechas de siembra, la rotación de cultivos, barbechos profundos, destrucción de malezas hospederas, son algunas de las más utilizadas y de las que mejores resultados se obtienen (Núñez, comunicación personal).

Este insecto posee un gran número de enemigos naturales, los cuales influyen en alguna medida en la reducción de las poblaciones. Algunos de ellos están siendo reproducidos masivamente y utilizados como agentes de control. Entre los principales enemigos naturales se pueden señalar los siguientes:

<u>Trichogramma</u> spp.	- Hymenóptera	: Braconidae
<u>Geocoris punctipes</u> (Say)	- Hemiptera	: Lygaeidae
<u>Chelonus texanus</u> (Cress)	- Hymenoptera	: Braconidae
<u>Calosoma calidum</u> (Fab.)	- Coleoptera	: Carabidae
<u>Zelus</u> spp.	- Hemiptera	: Reduviidae
<u>Hippodamia</u> spp.	- Coleoptera	: Coccinellidae

Aparte de los insectos, existen otros organismos capaces de reducir las poblaciones de H. virescens, como es el caso del virus de la polihedrosis nuclear y B. thuringiensis.

En lo que se refiere al control químico, es bastante discutido ya que ha tenido un sinnúmero de problemas debido a la resistencia de H. virescens a estos compuestos. En 1962, después de haber logrado controlar durante más de 15 años las plagas del algodón, en el Valle de Río Grande, Texas, U.S.A., se observó que H. virescens y H. zea habían desarrollado resistencia a varios clorados, incluyendo al DDT, y a los carbamatos; sin embargo, aún podían combatirse empleando elevadas dosis de parathión metílico. En 1968, comenzó a fallar este medio de lucha, cuando algunos agricultores no lograban controlar las plagas después de 15 y hasta 18 aplicaciones. Así mismo, H. virescens y H. zea pasaron, después de ser plagas menores, a ser más importantes que Anthonomus grandis, el

cual se convirtió en una plaga de poca importancia. De la misma forma, H. virescens se había convertido en el más perjudicial insecto del tabaco y no podía ser controlado. De Bach, (1974).

Aunque los insecticidas piretroides sintéticos son altamente activos contra Heliothis spp. y son usados para lograr su control en el algodón, hay indicios de que algunas razas de H. virescens resistentes al parathión metílico, pueden también tener tolerancia cruzada a estos químicos. Crowder et al., 1979; citados por Bull et al. (1979).

2.3.5. Bacillus thuringiensis en el control de Heliothis virescens.- B. thuringiensis ha sido recomendado desde 1963 para el control de H. virescens. El uso de insecticidas microbiales ha tenido ventajas en los programas de control de insectos.

Se mencionarán algunos de los trabajos que se han llevado a cabo con B. thuringiensis para el control de H. virescens tanto a nivel de laboratorio como en pruebas de campo.

Mc Garr et al., (1970) compararon la actividad insecticida del aislamiento HD-1 de B. thuringiensis, con tres insecticidas químicos y dos mezclas de ellos, en contra de H. vires-

cens, obteniendo mejores resultados con HD-1 que con cualquiera de los insecticidas probados, incluyendo las mezclas.

Johnson (1974) bajo condiciones de campo, logró controlar satisfactoriamente a H. virescens con varias formulaciones comerciales de B. thuringiensis, obteniendo mejores resultados que los insecticidas utilizados para el control de este insecto.

Bell y Romine (1980), mezclando una formulación comercial de virus de la polihedrosis nuclear con la formulación HD-1 de B. thuringiensis, logran reducir en forma significativa, el número de cuadros de algodón dañados por H. virescens.

Alí y Watson (1982), utilizando una formulación de B. thuringiensis en combinación con el predator Geocoris punctipes, reducen en forma drástica el número de larvas de H. virescens, en el cultivo del algodón. El mismo año, estos mismos investigadores, utilizando B. thuringiensis var. kurstaki contra huevecillos y adultos de H. virescens, reduciendo el número de larvas eclosionadas y la longevidad de los adultos.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Ubicación.- El presente estudio se efectuó en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León en el Laboratorio de Cría Masiva de Insectos, Carretera Zuzua-Marín, Km. 17, Marín, N.L.

Para establecer los bioensayos, se requería de una cría de Heliothis virescens Fabricius, la cual se desarrolló de la siguiente forma:

3.2. Desarrollo larval.- Las larvas de primer instar se colocaban en recipientes de plástico de 5 x 3 x 5.5 cm. los cuales contenían 5 ml. de dieta artificial, constituido por agua destilada, harina de soya, germen de trigo, sal Wesson's, azúcar comercial, parametilhidroxibenzoato, ácido sórbico, ácido ascórbico, auromicina, hidróxido de potasio (22%), solución vitamínica, cloruro de colina (15%), formaldehído (10%), ácido acético (25) y agar-agar. La proporción de cantidades y metodología en la preparación de la dieta se realizó según Núñez (1980).

Una vez colocadas las larvas individualmente en los recipientes que contenían dieta, eran colocadas en un recinto, previamente tratado con fenol al 1% para evitar contaminantes ajenos. Las condiciones para el desarrollo larvario fue-

ron las siguientes: Temperatura $26^{\circ}\text{C} \pm 3$, Humedad relativa 60 - 70%, Fotoperíodo 11 hr, y controlados mediante un calentador eléctrico de 1320 W, vaportizador de 5 litros y lámpara de gas neon. El desarrollo larvario se obtenía en 17.66 días bajo estas condiciones.

3.3. Pupación.- Al finalizar el desarrollo larvario, las pupas eran recolectadas y sexadas para colocarse en cámaras de emergencia con dimensiones de 25 x 24 cm, siendo estos recipientes de cartón. Las pupas se colocaban en grupos de 25, en relación de 3 hembras por 2 machos.

Las condiciones ambientales para la pupación fueron iguales a las anteriores, a diferencia de la humedad relativa que en éste caso fue de 90 a 100%. El período de pupación fue de 9 días bajo estas condiciones.

3.4. Emergencia de Adultos y Oviposición.- Al emerger los adultos, eran cubiertas las cámaras en su interior con papel celofan y una manta como tapa para recolectar los huevecillos con facilidad, haciéndose cambios a diario. Los adultos se alimentaron con una solución de miel de abeja, solución vitamínica y agua destilada en relación 1:1:20; a esta solución se agregaba 0.5 gr. de parametilhidroxibenzoato y 0.3 gr. de ácido ascórbico.

Las condiciones en las que se desarrollaron adultos y huevecillos fueron: Temperatura $26^{\circ}\text{C} \pm 3$, Humedad relativa 90 - 100% y Fotoperíodo 11 hr. La vida promedio de los adultos fue de 17.5 días, ovipositando 162 huevecillos (\bar{X}) por hembra, con 95% de viabilidad y eclosionaban en 4 días.

3.5. Bioensayos.- Estos consistieron en incorporar 500 μg de extracto de Bacillus thuringiensis Berliner por ml. de dieta artificial, mediante una dilución de 1:10, correspondiendo una parte al extracto prueba en solución buffer pH 7 y diez para la dieta, para tener una mezcla uniforme se agitó a 1,000 r.p.m. aproximadamente durante 30 segundos y vertida a recipientes de plástico descritos anteriormente.

Se realizaron dos bioensayos, uno correspondiente a probar los extractos de Bacillus thuringiensis GM-7, 8, 9, 10, 11, 12 y HD-1; este bioensayo consistió en 8 tratamientos, correspondientes a los extractos y un testigo, con 5 repeticiones por tratamiento y 15 larvas por unidad experimental. En el segundo bioensayo se probaron los extractos GM-1, 2, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y HD-1 consistiendo en 11 tratamientos, 10 correspondientes a los extractos y un testigo, con 5 repeticiones por tratamiento y 15 larvas por unidad experimental.

Las condiciones promedio para ambos bioensayos fueron: Temperatura 26.6 °C, Humedad relativa 64.36%, Fotoperíodo 11 horas.

Las variables a medir fueron: porcentaje de mortalidad, longitud y peso larval para ambos bioensayos. La toma de datos se realizó a las 72 horas.

3.6. Evaluaciones.- Para evaluar el efecto de los extractos se realizó un diseño completamente al azar bajo el modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Para cada variable de estudio se realizó análisis de varianza con las siguientes hipótesis:

H_0 : No hay diferencia entre efectos de los tratamientos.

H_1 : Al menos un tratamiento tiene efecto diferente.

Dado que al analizar el experimento, se comprobó la H_1 se hizo necesario efectuar comparación múltiple de medias para cada variable del estudio, usando el método de Tukey (DMSH).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

En los experimentos que se realizaron durante el presente estudio, se utilizó un testigo y el estandar internacional HD-1-S-71, para tener mayor confiabilidad en los resultados y comparar la toxicidad del estandar con los demás tratamientos. Como se puede observar en la tabla 2 y 3, se presentan los resultados del testigo y el HD-1-S-71, los cuales se comportaron de manera similar en ambos experimentos, en estas mismas tablas se expresan los resultados relativos al peso promedio de larvas sobrevivientes, la longitud larval promedio y los porcentajes de mortalidad larval. Todos estos resultados se presentan como una respuesta de las larvas de Heliothis virescens a una dosis de 500 μ g del extracto del complejo esporo-cristal de Bacillus thuringiensis (Berliner) por ml. de dieta y comprendido en las cepas: GM-7, GM-8, GM-9, GM-10, GM-11 y GM-12 en el experimento I y las cepas: GM-1, GM-2, Gm-13, GM-14, GM-15, GM-16, GM-17, GM-18, GM-19 en el experimento II.

4.1. Reducción del peso larval.

Para analizar la variable peso larval fue necesario eliminar el tratamiento siete, cepa HD-1 en el experimento I y los tratamientos 8 y 9, cepas HD-1 y GM-1 en el experimento II. Esto debido a que fueron los tratamientos con mayor morta

TABLA 2. Resultados de las variables: peso, longitud y porcentaje de mortalidad en larvas de primer instar de Heliothis virescens sometidas a la actividad de sies cepas Bacillus thuringiensis por 72 horas.

E X P E R I M E N T O I

	GM-7	GM-8	GM-9	GM-10	GM-11	GM-12	HD-1	TESTIGO
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈
R ₁	Pe.	.177	.210	.990	.150	.20	.23	.10*
	Me.	2.58	2.17	3.570	2.55	2.45	2.25	1.86
	Mo.	13.33	20	13.33	33.33	26.66	6.66	73.33
R ₂	Pe.	.180	.244	1.050	.122	.24	.29	.10*
	Me.	2.55	2.18	4.37	1.77	1.99	2.27	1.33
	Mo.	20	20	0	26.66	26.66	0	80
R ₃	Pe.	.180	.260	1.00	.111	.25	.24	.10*
	Me.	2.68	2.29	4.19	2.46	1.97	2.35	1.76
	Mo.	13.33	20	6.66	26.66	33.33	13.33	73.33
R ₄	Pe.	.190	.250	1.17	.140	.20	.24	.10*
	Me.	2.60	2.25	4.30	2.16	2.18	2.47	1.30
	Mo.	13.33	13.33	0	26.66	26.66	0	73.33
R ₅	Pe.	.178	.230	1.16	.100	.163	.21	.10*
	Me.	2.18	2.07	3.79	2.15	1.91	2.43	1.46
	Mo.	20	26.66	6.66	40	33.33	0	80

* Peso promedio de todo el tratamiento.

Pe = Peso promedio por repetición en mg.

Me = Medidas larvales promedio por repetición en mm.

Mo = Porcentaje de mortalidad promedio por repetición.

TABLA 3. Resultados de las variables: peso, longitud y porcentaje de mortalidad en larvas de primer instar de *Heliothis virescens* sometidas a la actividad de diez cepas de *Bacillus thuringiensis* por 72 horas.

E X P E R I M E N T O II											
	GM-13	GM-14	GM-15	GM-16	GM-17	GM-18	GM-19	HD-1	GM-1	GM-2	TESTIGO
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉	T ₁₀	T ₁₁
R ₁	Pe. 3.34	1.62	2.26	2.35	1.43	3.39	3.20	.08*	.175*	3.37	3.16
	Me. 5.15	4.66	5.50	5.13	4.70	5.63	5.83	1.23	2.24	4.80	5.66
	Mo. 6.66	0	0	0	6.66	6.66	0	73.33	40	0	0
R ₂	Pe. 3.17	1.81	1.95	2.87	1.93	2.29	3.82	.08*	.175*	2.75	3.88
	Me. 5.80	4.10	4.99	5.80	4.56	5.03	6.06	1.71	21.0	4.87	6.06
	Mo. 0	6.66	0	0	6.66	0	0	73.33	46.66	6.66	0
R ₃	Pe. 2.60	1.60	2.38	2.31	2.60	3.25	2.44	.08*	.175*	3.71	2.90
	Me. 5.66	4.53	5.21	5.80	6.06	5.14	5.33	1.61	2.14	4.40	5.50
	Mo. 0	0	0	0	0	6.66	0	80	40	0	0
R ₄	Pe. 2.66	1.70	2.61	2.01	1.93	2.25	2.91	.08*	.175*	2.43	3.09
	Me. 5.23	4.13	5.36	5.46	5.00	5.06	5.46	1.36	1.94	3.87	6.36
	Mo. 6.66	0	0	0	6.66	0	0	73.33	46.66	0	0
R ₅	Pe. 2.85	1.68	2.67	4.13	2.09	2.70	2.51	.08*	.175*	3.08	3.43
	Me. 5.13	4.26	5.56	6.73	5.16	5.56	5.14	1.09	2.02	4.27	5.53
	Mo. 0	0	0	0	0	0	0	66.66	53.33	0	0

* Peso promedio de todo el tratamiento.

Pe = Peso promedio por repetición en mg.

Me = Medidas larvales promedio por repetición en mm.

Mo = Porcentaje de mortalidad larval promedio por repetición.

lidad y con pocas larvas sobrevivientes, y no fue posible obtener el peso promedio por repetición, sino el peso promedio por tratamiento como se observa en las tablas 2 y 3.

Los datos de los pesos promedio de las tablas 2 y 3 fueron revisados en su mortalidad y se encontró que los rangos de las observaciones por tratamiento, diferían mucho entre tratamientos, principalmente el testigo con los tratamientos en el experimento I; por lo que se realizó una transformación $\sqrt{X + 1}$, que es la indicada para conteos pequeños. Las tablas 4 y 5 presentan los datos transformados y las tablas 6 y 7 presentan los análisis de varianza de ellos, en los cuales se observan diferencias altamente significativas en los tratamientos para ambos experimentos, por lo cual se rechazan las hipótesis nulas de igualdad de medias y se acepta que al menos un extracto redujo más el peso de las larvas que el testigo.

En la tabla 8 se muestra la prueba de medias y en las figuras 1 y 2 los porcentajes de reducción de los pesos larvales, en las cuales se puede observar que en el experimento I, todas las cepas son estadísticamente iguales con una reducción de peso de 91.27 a 95.44% con excepción del tratamiento 3; cepa GM-9 la cual redujo el peso de las larvas tan sólo 60.72%. En el experimento II el tratamiento 2; cepa GM-14 fue la más activa reduciendo el peso larval en un 48.90%, los tra

TABLA 4. Transformación $\sqrt{X + 1}$ de los pesos promedio de larvas de Heliothis virescens sometidas a la actividad de seis cepas de Bacillus thuringiensis por 72 horas.

E X P E R I M E N T O I							
	GM-7	GM-8	GM-9	GM-10	GM-11	GM-12	TESTIGO
R ₁	1.085	1.100	1.411	1.072	1.095	1.109	2.020
R ₂	1.086	1.115	1.432	1.059	1.114	1.136	1.982
R ₃	1.086	1.122	1.414	1.054	1.118	1.114	1.838
R ₄	1.091	1.118	1.473	1.068	1.095	1.114	1.844
R ₅	1.0850	1.109	1.470	1.049	1.079	1.100	1.970
\bar{X}	1.0866	1.1128	1.440	1.0604	1.100	1.1146	1.9308

TABLA 5. Transformación $\sqrt{X + 1}$ de los pesos promedio de larvas de Heliothis virescens sometidas a la actividad de ocho cepas de Bacillus thuringiensis por 72 horas.

E X P E R I M E N T O II									
	GM-13	GM-14	GM-15	GM-16	GM-17	GM-18	GM-19	GM-2	TESTIGO
R ₁	2.083	1.619	1.806	1.830	1.559	2.095	2.049	2.090	2.040
R ₂	2.042	1.676	1.718	1.967	1.712	1.814	2.195	1.936	2.209
R ₃	1.897	1.612	1.838	1.819	1.897	2.062	1.855	2.170	1.975
R ₄	1.913	1.643	1.900	1.735	1.712	1.803	1.977	1.852	2.022
R ₅	1.962	1.637	1.916	2.265	1.758	1.924	1.873	2.020	2.105
\bar{X}	1.9794	1.6374	1.8356	1.9232	1.7276	1.9396	1.9898	2.0136	2.0702

TABLA 6. Análisis de varianza de los pesos larvales transformados a $\sqrt{X + 1}$ -Experimento I-.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F. Cal.	F. Tabulada	
					0.05	0.01
Tratamientos	6	3.1029924	0.5171654	422.52075**	2.44	3.53
Error	28	0.0342736	0.0012240			
Total	34	3.137266				

** = Diferencia altamente significativa
C.V. = 0.0123821

TABLA 7. Análisis de varianza de los pesos larvales transformados a $\sqrt{X + 1}$ -Experimento II-.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F. Cal.	F. Tabulada	
					0.05	0.01
Tratamientos	8	0.8057286	0.100716	6.8042616**	2.21	3.04
Error	36	0.5328714	0.0148019			
Total	44	1.3386				

** = Diferencia altamente significativa
C.V. = 0.028609075

TABLA 8. Comparación de medias en pesos larvales de Heliothis virescens inoculadas con 500 μ g de Bacillus thuringiensis por ml. de dieta artificial.

EXPERIMENTO I			EXPERIMENTO II		
Tratam.	Medias Originales	Pesos larvales transformados	Tratam.	Medias Originales	Pesos larvales transformados
8	2.734	1.9308	11	3.292	2.0702
3	1.074	1.44	10	3.069	2.0136
6	0.242	1.1146	7	2.976	1.9898
2	0.2388	1.1128	1	2.924	1.9794
5	0.2106	1.1	6	2.776	1.9396
1	0.181	1.0866	4	2.734	1.9232
4	0.1246	1.0604	3	2.374	1.8356
			5	1.996	1.7276
			2	1.682	1.6374

Literales distintas indican medias diferentes.

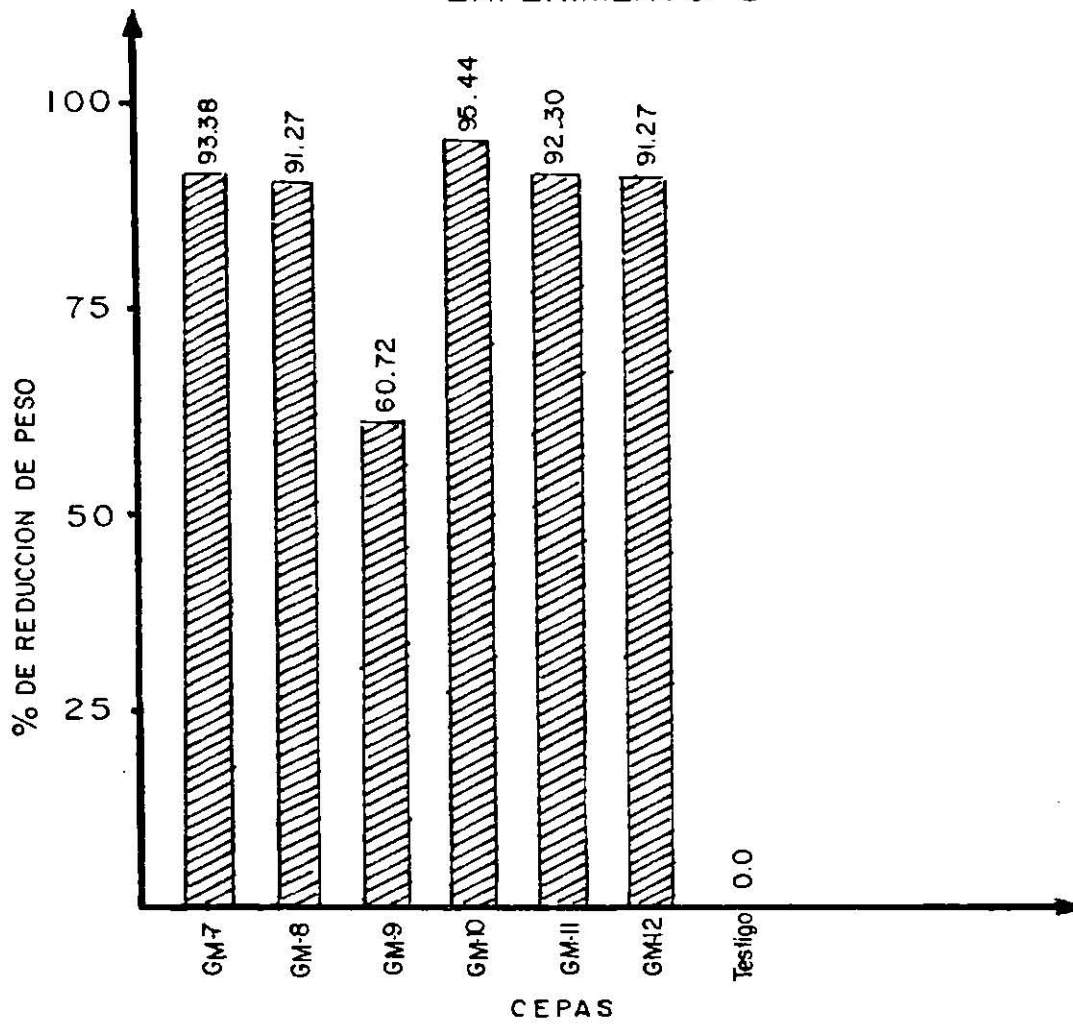


FIG. 1. Porcentaje de reducción de pesos larvales

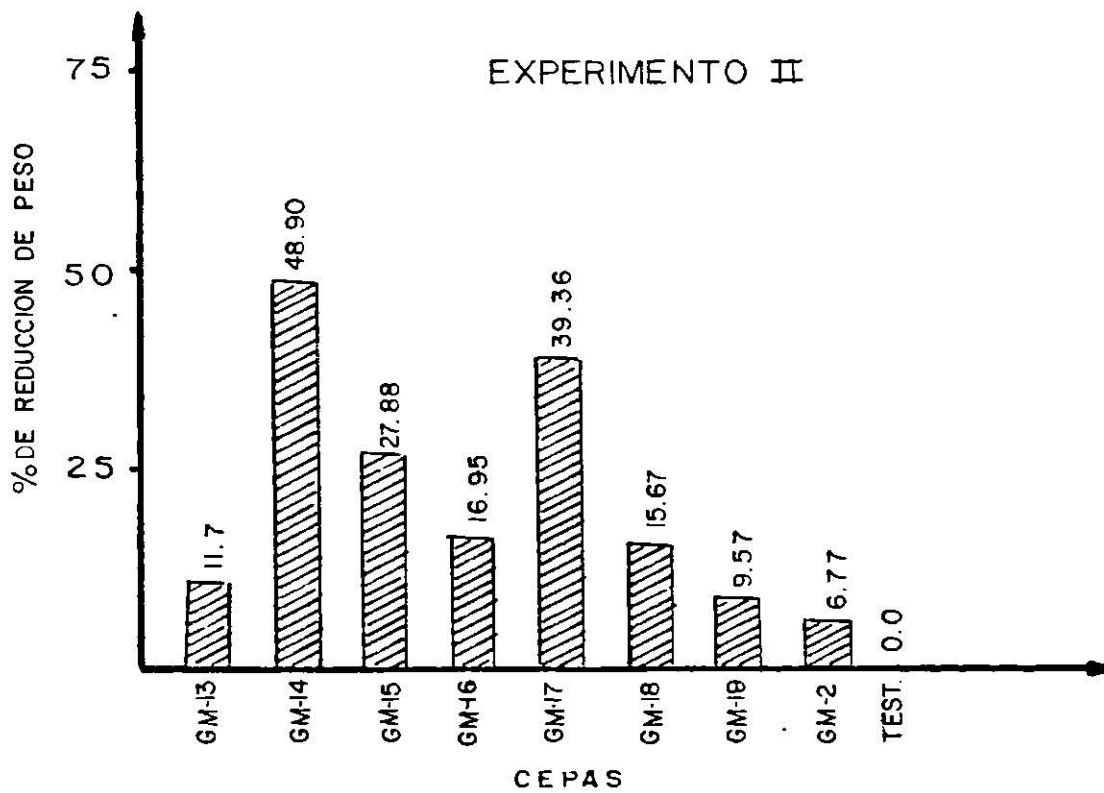


FIG. 2. Porcentaje de reducción de pesos larvales

tamientos menos activos fueron el 7 y 10; cepas GM-19 y GM-12 reduciendo el peso en un 9.57 y 6.77% respectivamente. El resto de los tratamientos redujeron el peso entre 39.36 y 11.17%.

Aunque en el experimento I casi no hubo diferencia estadística significativa entre tratamientos, pudiéndose observar que presentó más reducción de los pesos larvales que con las cepas utilizadas en el experimento II, a excepción de la cepa GM-11 la cual redujo el peso al grado tal, que no fue posible tomar datos para analizarlos estadísticamente.

Las diferencias de peso encontradas pueden deberse a que se utilizaron diferentes variedades tales como kumanotoensis, kurstaki, colmeri, morrisoni, ostriniaae. Aunque aún - dentro del mismo serovar se pueden encontrar diferencias como lo reportó Ochoa (1983). El cual encontró diferencias en los pesos larvales utilizando una misma cepa (GM-1) producida en diferentes medios de fermentación.

4.2. Reducción de longitud larval.

Las tablas 9 y 10 presentan los análisis de varianza para la longitud larval en las cuales se observan diferencias altamente significativas en los tratamientos para ambos experimentos, por lo cual se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y se acepta que al menos un tratamiento redujo

TABLA 9. Análisis de varianza de longitud larval. Experimento I.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F. Cal.	F. Tabulada	
					0.05	0.01
Tratamientos	7	53.922298	7.7031854	148.61317**	2.32	3.25
Error	32	1.658682	0.0518338			
Total	39	55.58098				

** = Diferencia altamente significativa
 C.V. = 0.036601883

TABLA 10. Análisis de varianza de longitud larval. Experimento II.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F. Cal.	F. Tabulada	
					0.05	0.01
Tratamientos	10	11.65664	11.165664	79.983266**	2.05	2.75
Error	44	6.1424	0.1396			
Total	54	117.79904				

** = Diferencia altamente significativa
 C.V. = 0.03637628

el tamaño de las larvas significativamente con relación al testigo. En la tabla 11 se muestra la prueba de medias y en las figuras 3 y 4 los porcentajes de reducción de la longitud larval para ambos experimentos. En el experimento I se observa que los tratamientos 1, 6, 4, 2 y 5 se comportan estadísticamente igual variando entre 52.36 y 60.27% la reducción de la longitud larval. El tratamiento 7; cepa HD-1 fue la que más redujo la longitud larval con 70.83% y el menos activo fue el tratamiento 3; cepa GM-9 con un 23.5% de reducción en la longitud. En el experimento II, los tratamientos 8 y 9 - HD-1 y GM-1 - fueron los que redujeron más la longitud larval con 75.95 y 64.13% respectivamente, el resto de los tratamientos tuvieron reducciones de 25.52 al 0.65% siendo esta última el tratamiento 4; cepa GM-16. Comparando ambos experimentos se puede observar que el estandar internacional HD-1-S-1971 se comportó de forma similar en ambos experimentos. La mayoría de los tratamientos correspondientes al experimento I fueron más activos que los probados en el experimento II, con excepción del tratamiento 9; cepa GM-1, la cual fue la más activa de todas las cepas probadas sin incluir la HD-1-S-1971.

Castro (1982) reporta una disminución en el desarrollo larvario en Spodoptera frugiperda (Smith) al probar diferen-

TABLA 11. Comparación de medias para longitud larval de Heliothis virescens.

EXPERIMENTO I		EXPERIMENTO II	
Tratan.	Medias	Tratam.	Medias
	0.05		0.05
8	5.286	11	5.822
3	4.044	4	5.784
1	2.518	7	5.564
6	2.354	1	5.394
4	2.218	3	5.324
2	2.192	6	5.284
5	2.10	5	5.090
7	1.542	10	4.442
		2	4.336
		9	2.088
		8	1.400

Literales distintas indican medias diferentes.

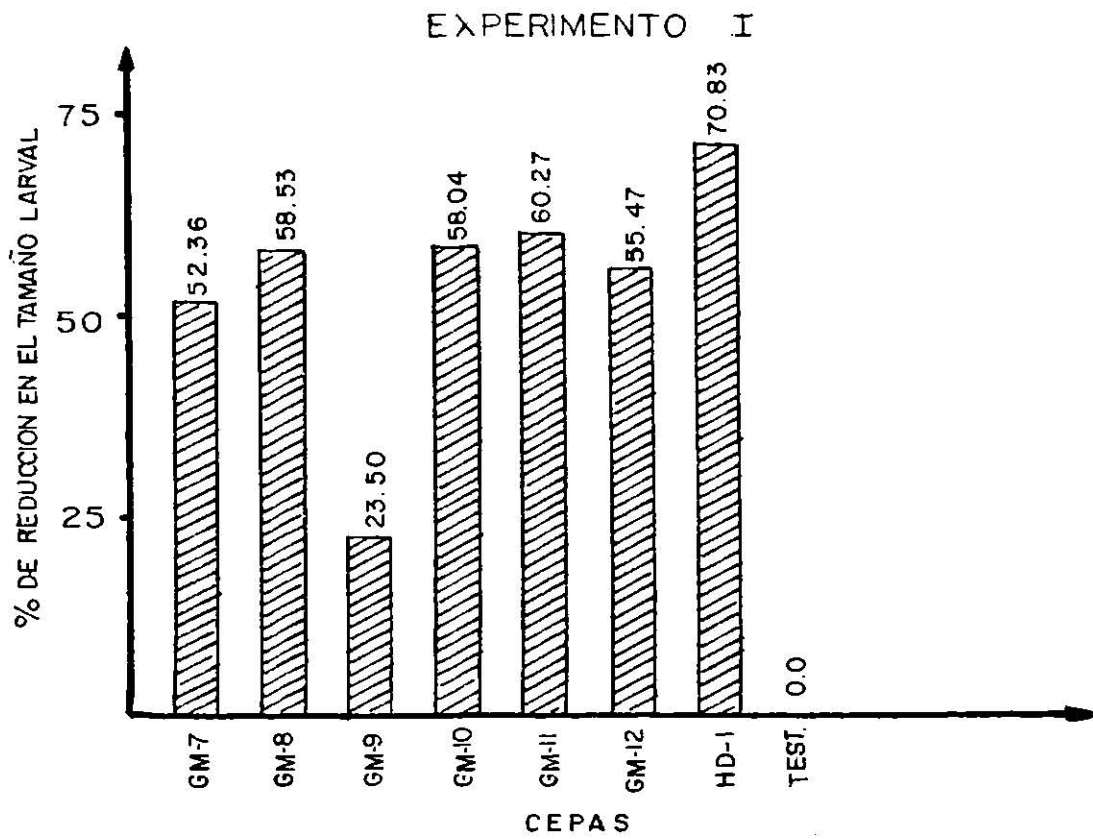


FIG 3. Porcentaje de reducción del tamaño larval

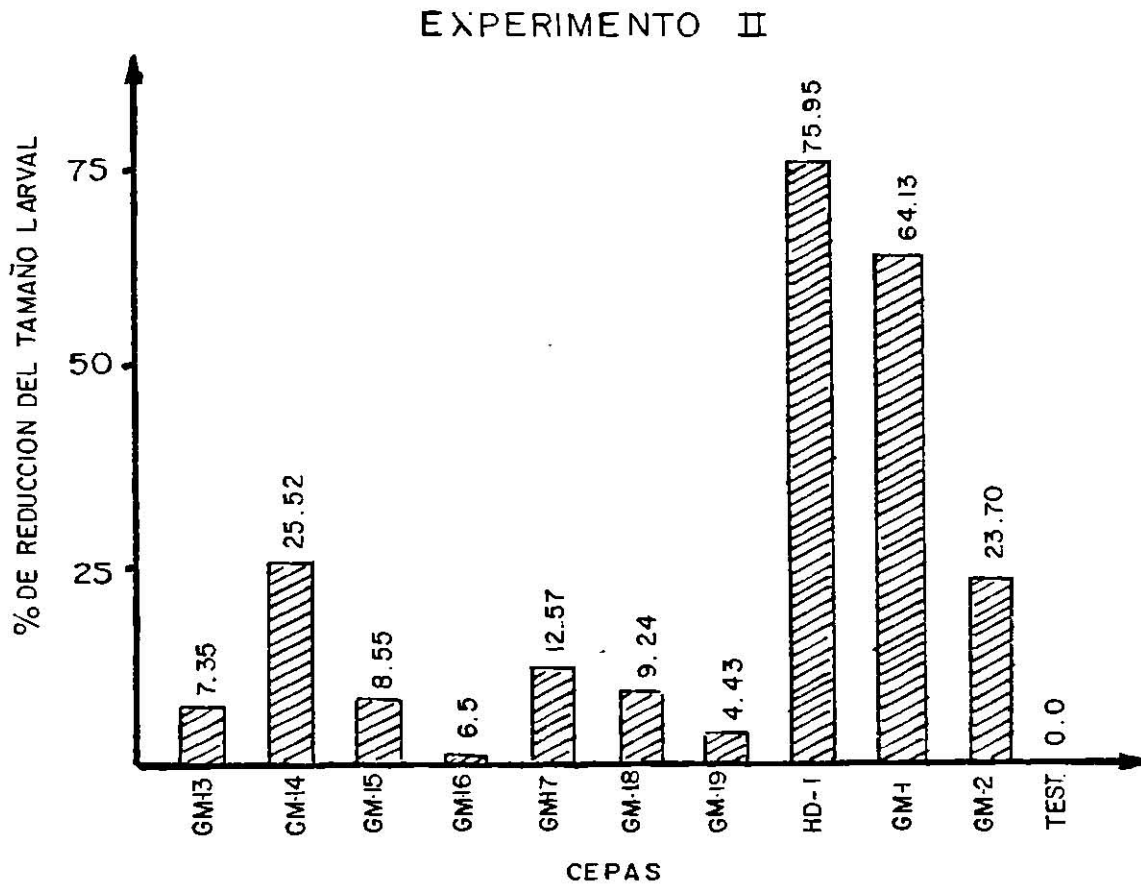


FIG. 4. Porcentaje de reducción del tamaño larval

tes medios de cultivos de las cepas GM-1 y GM-2; también en H. virescens y Manduca sexta por Dulmage et al. y Scherrer et al. citados por Castro (1982) aunque de estos datos no presentan pruebas estadísticas para ninguno de los casos. Posteriormente, Ochoa (1983) reporta diferencias estadísticas significativas en la reducción del tamaño larval de S. frugiperda al probar diferentes medios de cultivo de la cepa GM-1.

4.3. Porcentaje de mortalidad larval.

Para analizar los datos de la variable mortalidad larval, se utilizaron números de larvas sobrevivientes con la finalidad de simplificar la interpretación del análisis de varianza y evitar cualquier transformación innecesaria. En las tablas 12 y 13 aparece el número de larvas sobrevivientes por tratamiento en cada uno de los experimentos. En los análisis de varianza de las tablas 14 y 15, se observa que existe una diferencia altamente significativa en los tratamientos, por lo cual se rechaza la hipótesis de igualdad de tratamientos y se concluye que al menos existe un tratamiento que permitió menor sobrevivencia larval que el testigo. En la tabla 16 se presenta la comparación múltiple de medias y en las figuras 5 y 6 los porcentajes de mortalidad larval. Como se puede ver en el experimento I, los tratamientos que permitieron menor sobrevivencia larval fueron: el 5, 4 y 7; GM-10, GM-11 y

TABLA 12. Larvas de Heliiothis virescens que sobrevivieron después de 72 horas en dietas inoculadas con 500 μ g de Bacillus thuringiensis GM-7 a GM-12 por ml. de dieta.

E X P E R I M E N T O I								
Repet.	TRATAMIENTOS							
	1	2	3	4	5	6	7*	8
R ₁	13	12	13	10	12	14	4	15
R ₂	12	12	15	11	11	15	3	15
R ₃	13	12	14	11	10	13	4	15
R ₄	13	13	15	11	11	15	4	15
R ₅	12	11	14	9	10	15	3	15
\bar{X}	12.6	12	14.2	10.4	10.8	14.4	3.6	15

La unidad experimental fue de 15 larvas distribuídas individualmente

* Extracto del estandar internacional HD-1-S-71

TABLA 13. Larvas de Heliiothis virescens que sobrevivieron después de 72 horas en dietas inoculadas con 500 μ g de Bacillus thuringiensis GM-1, GM-2; GM-13 a GM-19 por ml. de dieta.

E X P E R I M E N T O II											
Repet.	TRATAMIENTOS										
	1	2	3	4	5	6	7	8*	9	10	11
R ₁	14	15	15	15	14	14	15	4	9	15	15
R ₂	15	14	15	15	14	15	15	4	8	14	15
R ₃	15	15	15	15	15	14	15	3	9	15	15
R ₄	14	15	15	15	14	15	15	4	8	15	15
R ₅	15	15	15	15	15	15	15	5	7	15	15
\bar{X}	14.6	14.8	15	15	14.4	14.6	15	4	8.2	14.8	15

La unidad experimental fue de 15 larvas distribuídas individualmente

* Extracto del estandar internacional HD-1-S-71

TABLA 14. Análisis de varianza para larvas de Heliothis virescens, que sobrevivieron en dietas inoculadas con 500 μ g de Bacillus thuringiensis GM-7 a GM-12 por ml. de dieta.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F. Cal.	F. Tabulada	
					0.05	0.01
Tratamientos	7	466.975	66.710714	130.16725**	2.32	3.25
Error	32	16.40	0.5125			
Total	39	486.375				

** = Diferencia altamente significativa

C.V. = 0.0275403

TABLA 15. Análisis de varianza para larvas de Heliothis virescens que sobrevivieron en dietas inoculadas con 500 μ g de Bacillus thuringiensis GM-1, GM-2; GM-13 a GM-19 por ml. de dieta.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F. Cal.	F. Tabulada	
					0.05	0.01
Tratamientos	10	665.38182	66.53812	292.76804**	2.05	2.75
Error	44	10	0.2272727			
Total	54	675.38182				

** = Diferencia altamente significativa

C.V. = 0.0161293

TABLA 16. Comparación de medias de los tratamientos correspondientes a cepas de Bacillus thuringiensis medidas en su actividad contra larvas de Heliothis virescens.

EXPERIMENTO I		EXPERIMENTO II	
Tratam.	Medias	Tratam.	Medias
8	15	11	15
6	14.4	7	15
3	14.2	4	15
1	12.6	3	15
2	12	2	14.8
5	10.8	10	14.8
4	10.4	1	14.6
7	3.6	6	14.6
		5	14.4
		9	8.2
		8	4

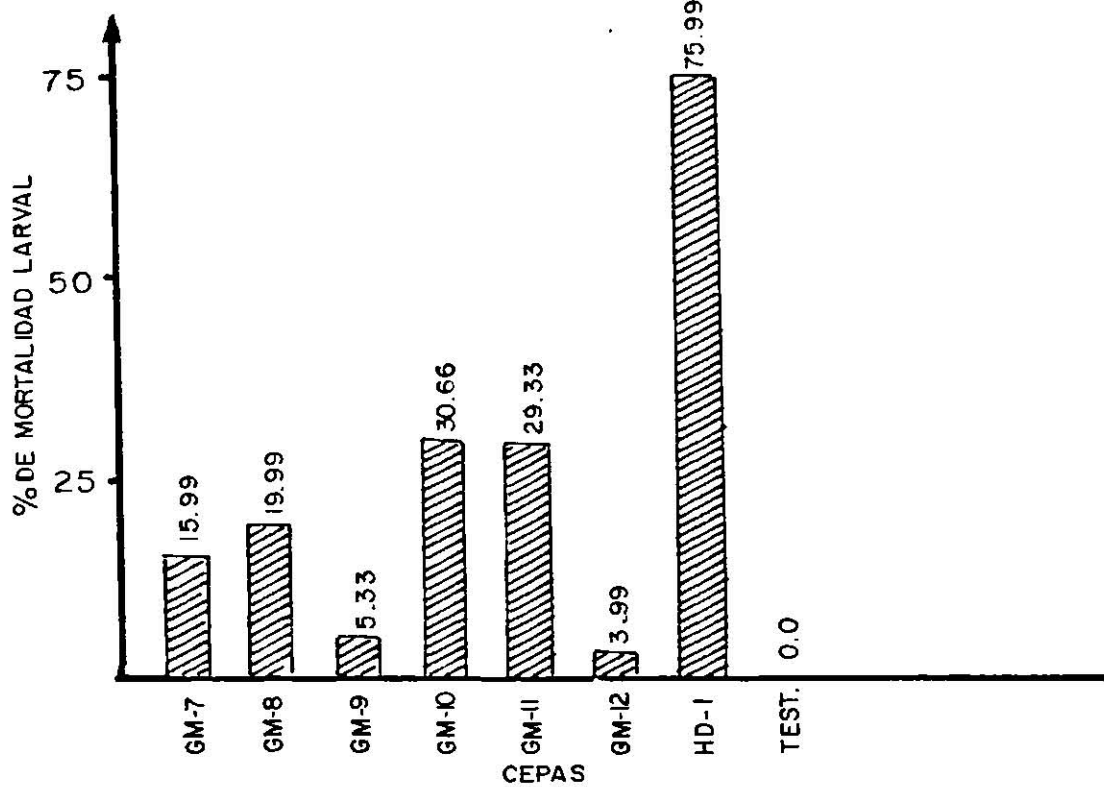


FIG. 5. Porcentaje de mortalidad larval de *H. virescens* al inocularse con diferentes cepas de *B. thuringiensis*

EXPERIMENTO II

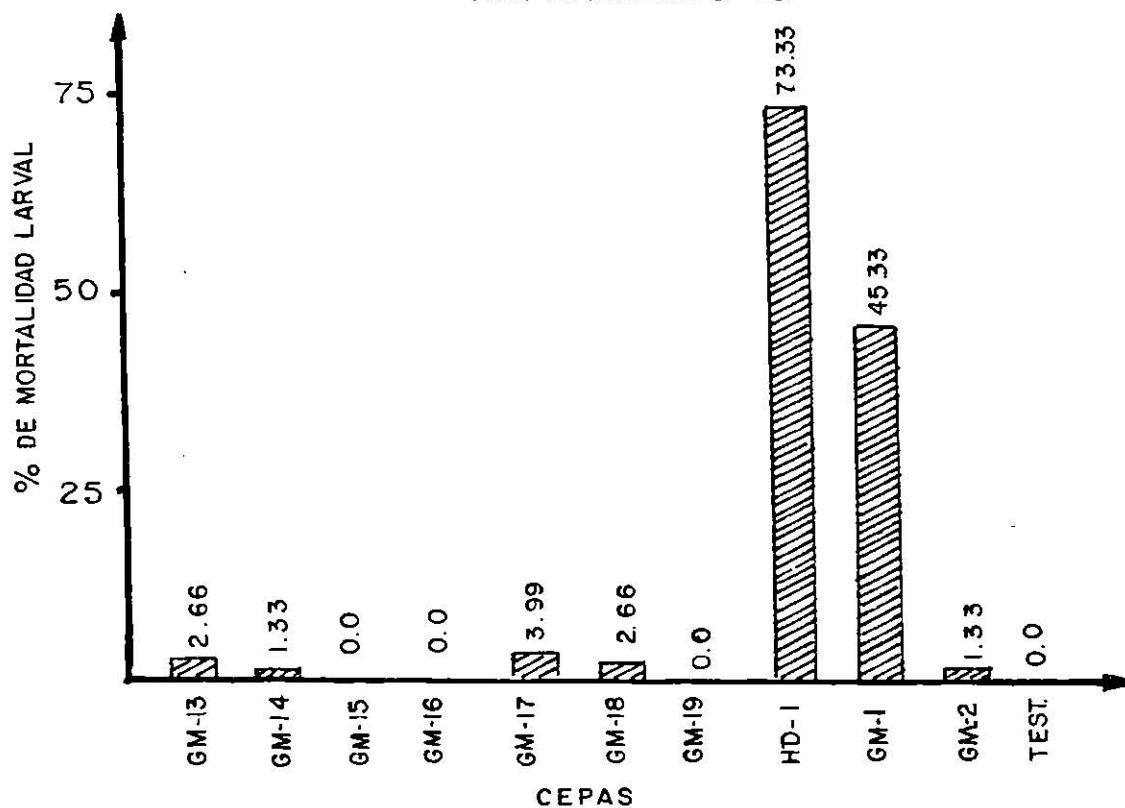


FIG 6. Porcentaje de mortalidad larval de *H. virescens* al inocularse con diferentes cepas de *B. thuringiensis*

HD-1; 29.33, 30.66 y 75.99% de mortalidad respectivamente; los tratamientos menos activos fueron el 3 y 6; GM-9 y GM-12 con 5.33 y 3.99% de mortalidad.

En el experimento II los tratamientos 9 y 8; GM-1 y HD-1 fueron los que presentaron mayor actividad con 45.33 y 73.33% de mortalidad larval, el resto de los tratamientos reportaron una alta sobrevivencia de larvas habiendo tres tratamientos que se compararon con el testigo por su nula actividad con respecto a la mortalidad larval; estos fueron los tratamientos 3, 4 y 7; GM-15, GM-16 y GM-19.

4.4. Discusión general.

Aunque se tuvieron diferencias significativas tanto en la reducción de peso, reducción de la longitud y porcentaje de mortalidad en ambos experimentos, los resultados antes descritos no son del todo satisfactorios, ya que según Dulmage* para que una cepa sea aceptable en términos de actividad insecticida, necesita producir una mortalidad del 100% a la dosis de 500 μ g/ml de dieta.

La falta de actividad de las cepas probadas es muy difícil de determinar, pero una causa puede atribuirsele a la

* Comunicación personal.

constitución genética de las cepas, las cuales producen δ -endotoxina con un espectro de actividad que no afecta a las larvas de H. virescens y si es activa contra otras larvas, citado por Dulmage (1981) y Dulmage y Aizawa (1982). Demostrado posteriormente por Martínez (1983) el cual encontró una mortalidad hasta de un 100% en estas mismas cepas, sólo que probadas contra Trichoplusia ni.

Otra de las causas a las que puede atribuirse la falta de actividad es a que los componentes utilizados en la fermentación para la obtención de las cepas, fueron incapaces de proporcionar actividad como lo cita Ochoa (1983). Los componentes utilizados para producir los extractos fueron: Dextrosa, harina de soya, líquido de remojo de maíz y CaCO_3 siendo estos componentes baratos pero probablemente incapaces de catalizar actividad a las cepas utilizadas y específicamente contra la plaga probada.

Castro (1982) reportó que sin CaCO_3 en la cepa GM-1 contra larvas S. frugiperda produjo mayor mortalidad que en presencia de CaCO_3 , reportando lo contrario en larvas de T. ni con la cepa GM-2.

Murga (1983) demostró que en ausencia de jugo de agave se tenía mayor potencia de la cepa GM-2 contra T. ni, siendo con-

trario contra H. virescens. Demostrando finalmente que dependiendo del medio utilizado varía la potencia de la cepa en una plaga determinada.

Como se puede observar es difícil determinar cual es la verdadera causa por la cual se presentó poca actividad insecticida en estos experimentos, ya que cabe la posibilidad de que estas cepas con estos medios sean activos contra otra plaga. Como lo demostró Martínez (1983). Pudiéndose también realizar cambios en los componentes utilizados en la producción de las cepas teniéndose así mejores resultados, por lo cual es necesario seguir estudiando diferentes medios de cultivo así como probar contra diferentes plagas, determinando así con mayor exactitud la verdadera actividad insecticida de cada una de las cepas.

ANEXO

El presente anexo se suscribe con la finalidad de orientar y aclarar sobre el origen y taxon de los extractos de Bacillus thuringiensis utilizados en el presente estudio.

Los extractos denominados arbitrariamente Gm-1, GM-2, GM-19, son aislados de suelo y fueron obtenidos por el Laboratorio de Microbiología Industrial de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Algunos de estos extractos han sido identificados por pruebas bioquímicas, de antígeno-flagelo y elisa, correspondiendo a las siguientes variedades y serovares.

Extracto	Variedad	Serovar
GM-1, GM-6, GM-7, GM-8, GM-9, GM-10	<u>colmeri</u>	20
GM-2*	<u>galanensis</u>	-
	<u>morrisoni</u>	8a 8b
GM-3	<u>sotto</u>	4a 4b
GM-4	<u>kumanotoensis</u>	18
GM-5	<u>ostriniaae</u>	8a 8c

* Aún existen discrepancias, ya que algunas pruebas coinciden con morrisoni 8a 8b.

Los extractos GM-11 a GM-19 aún no han sido identificados por el Laboratorio de Microbiología Industrial y Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1.- Las cepas que redujeron más los pesos larvales fueron: GM-7, GM-8, GM-10, GM-11 y GM-12 con 93.18, 91.27, 95.44, 92.30 y 91.27% respectivamente. Sin embargo, cabe aclarar que la cepa HD-1-S-1971 y la cepa GM-1 redujeron más los pesos de las larvas, ocasionando mayor mortalidad, por lo cual no fue posible tomar datos para analizarlos estadísticamente. Observando las mínimas reducciones de peso en las primeras cepas, se hace necesario realizar experimentos preliminares para detectar la inactividad de las cepas a probar.

2.- Las cepas HD-1-S-1971 y GM-1 redujeron el tamaño larval en un 73.39% (\bar{X}) y un 64.13%, siendo estas las más activas, en el resto de las cepas se registraron reducciones del 60.27 hasta de un 0.65% en la cepa GM-16, siendo esta la menos activa. Recomendándose estas mismas cepas contra otras especies de lepidopteros para así determinar su actividad.

3.- El estandar internacional HD-1-S-1971 variedad kurstaki supero en actividad a todas las cepas, produciendo una mortalidad de un 74.66% (\bar{X}), siguiéndole la cepa GM-1 con 45.33% de mortalidad, en el resto de las cepas se registraron mortalidades desde 0 hasta 30.66%. Recomendándose incrementar el tiempo de exposición de las larvas de 3 a 7 días en la die

ta inoculada con Bacillus thuringiensis, siendo esto para obtener una visión más exacta sobre la actividad de la cepa de B. thuringiensis a usar.

4.- Al evaluar la toxicidad de cada una de las cepas se concluyó que ninguna de las cepas probadas fue lo suficientemente activa contra Heliothis virescens, siendo incapaces de producir mortalidad superior al 90% con la dosis probada. Recomendándose ensayar las cepas desarrolladas en otros medios de cultivo, variando fuentes de carbono y/o sales para aumentar con esto la actividad de las mismas.

5.- La verdadera actividad insecticida de las cepas probadas de Bacillus thuringiensis no puede predecirse, ya que esta depende de: la constitución genética de la cepa, componentes usados para la obtención del extracto, condiciones de fermentación, el insecto utilizado en el estudio y algunas más, necesitándose realizar un estudio más completo para determinar con exactitud la actividad insecticida de cada cepa.

6.- Se requieren efectuar evaluaciones económicas sobre los costos de producción de las cepas obtenidas a partir de medios de fermentación baratos, como los usados en la obtención de las cepas incluídas en este estudio. Esto, con el fin de considerar si la diferencia de mortalidad aunque sea sig-

nificativa, correlacionándola con los costos de producción puede no serlo.

7.- Aunque la mortalidad fue baja para todos los tratamientos, como se señaló anteriormente, es de consideración la disminución en el peso y longitud larval, lo cual indica que es posible deducir, que puede haber una diferencia marcada si los experimentos se hubieran realizado en el campo, dado que la reducción en más de la mitad en peso y longitud de algunos tratamientos, hacen pensar en una mayor susceptibilidad de las larvas hacia factores climáticos inestables, parásitos predadores, competencia específica e interespecífica y otros factores; que bajo condiciones de laboratorio son controlados por los bioensayos.

6. RESUMEN

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Cría Masiva de Insectos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el cual fueron controladas las condiciones ambientales como: humedad, temperatura y fotoperíodo, por medio de un vaporizador, calentador eléctrico y lámparas de gas neon.

El diseño experimental fue un completamente al azar, con 8 tratamientos para el primer experimento y 11 tratamientos para el segundo experimento. Para ambos experimentos se realizaron 5 repeticiones. La unidad experimental consistió de 15 larvas de Heliothis virescens de primer instar. Las variables de estudio fueron: peso larval, tamaño larval y porcentaje de mortalidad. Se utilizó una dosis única de 500 g/ml de dieta artificial.

Siendo el objetivo evaluar la toxicidad del complejo -endotoxina espora de los serotipos de Bacillus thuringiensis obtenidos a partir de extractos en medios de fermentación.

Los resultados del porcentaje de reducción de peso, porcentaje de reducción en el tamaño larval y porcentaje de mortalidad variaron de: 60.72 a 95.44%; 23.50 a 70.83% y 5.33 a

75.99% respectivamente en el primer experimento y de 6.77 a 48.90%, 0.65 a 75.95% y 0.0 a 73.33% respectivamente en el segundo experimento.

Finalmente se concluye de que las cepas probadas la que se comportó más activa fue la cepa GM-1 y el estándar internacional HD-1-S-1971. Las cepas GM-7, GM-8, GM-10, GM-11 y GM-12 redujeron considerablemente el peso larval y el tamaño de las larvas, sin embargo, no fueron capaces de producir una mortalidad alta en las larvas tratadas.

7. BIBLIOGRAFIA

- Akehurst, B.C. 1973. El tabaco. Agricultura Tropical. Editorial Labor, S.A. pp. 474-475.
- Ali, A.A., and T.F. Watson. 1982. Effects of Bacillus thuringiensis var. kurstaki on Tobacco Budworm (Lepidoptera: Noctuidae) Adult and egg stages. J. Econ. Entomol. Vol. 75. pp. 596-598.
- _____. 1982. Efficacy of dipel and Geocoris punctipes (Hemiptera: Lygaeidae) against the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton. J. Econ. Entomol. Vol. 75. pp. 1002-1004.
- _____. 1982. Survival of Tobacco Budworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae after Short-Term feeding periods on cotton treated with Bacillus thuringiensis. J. Econ. Entomol. Vol. 75. pp. 630-632.
- Angus, T.A. 1962. The biochemistry and mode of action of Bacillus thuringiensis Berliner and its varieties. Entomophaga. Men. Hors. ser. Vol. 2. pp. 165-193.
- Arroyo, R. 1982. Producción de bioinsecticida a partir de medios con almidón usando Bacillus thuringiensis GM-2. Te-

sis Q.B.P., Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.
Monterrey, N.L. México.

Bates, B.H. and J. Osborn. 1958. Cotton. Mc Graw-Hill Book
Company, Inc. Third edition. pp. 210-213.

Beegle, C.C., Dulmage, H.T., Wolfenbarger, D.A. and Martínez,
E. 1981. Persistence of Bacillus thuringiensis Berliner
insecticidal activity on cotton foliage. J. Environ.
Entomol. Vol. 10. pp. 400-401.

Bell, M.R. and C.L. Romine. 1980. Tobacco budworm field
evaluation of microbial control in cotton using Bacillus
thuringiensis and Nudear Polyhedrosis virus with a feed-
ing adjuvant. J. Econ. Entomol. Vol. 73. pp. 427-430.

Bonnefoi, A., A. Borgerjon and P. Grison. 1958. Titrage bio-
logique des preparations de spores de Bacillus thuringien-
sis. C.R. Acad. Sci. Vol. 247. pp. 1418-1420.

Bonnier, G. y O. Tedrin. 1966. Bioestadística. Editorial
Acribia. pp. 62-65; 169-180.

Borror, D.J., D.M. De Long and C.A. Triplehorn. 1976. An in-
troduction to the study of insects 4th. Ed. Holt,
Rinehart and Winton, New York. p. 852.

- Boullé, A.L. 1975. Gusano Bellotero. III Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. pp. 157-162.
- Brock D., Thomas. 1973. Biología de los microorganismos. Ed. Omega. pp. 546-550.
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th. Ed. The Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 530-536.
- Bull, D.L., V.S. House, J.R. Ables, and R.K. Morrison. 1979. Selective methods for managing insect pest of cotton. J. Econ. Entomol. Vol. 72. pp. 841-846.
- Burges, H.D. and E.M. Thomson. 1971. Standardization and assay of microbial insecticides. In: Microbial control of insects and mites (H.D. Burges and N.W. Hussey, Eds.) Academic Press, London. pp. 591-622.
- Cantweell, G.E., and Franklin, B.A. 1966. J. Inverteb. Pathol, Vol. 8. pp. 256-258.
- Castro, J.H. 1982. Toxicidad de Bacillus thuringiensis GM-1 y GM-2 en Spodoptera frugiperda y Trichoplusia ni (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Monterrey, N.L.

- De Bach, Paul. 1974. Lucha biológica contra los enemigos de las plantas. Ediciones Mundi-Prensa. pp. 34-35.
- Doetsch, R.N. and T.M. Cook. 1973. Introduction to bacteria and their ecobiology. University Park Press. pp. 70-71.
- Dulmage, H.T., A.J. Martínez and T. Peña. 1976. Bioassay of Bacillus thuringiensis (Berliner) δ -endotoxina using the tobacco budworm. Technical Bulletin No. 1528. Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture in cooperation with Texas Agricultural Experiment Station. Washington, D.C. pp. 1-15.
- Dulmage, H.T. 1970. Insecticidal activity of H.D.-1 a new isolate of Bacillus thuringiensis var. alesti. J. Invertebr. Pathol. Vol. 15. pp. 232-239.
- Dulmage, H.T. and K. Aizawa. 1982. Distribution of Bacillus thuringiensis in Nature, In. Microbial and Viral Pesticides (E. Jurstak, Ed.) Marcel Dekker Inc., New York. pp. 209-234.
- Dulmage, H.T. 1981. Production of bacteria for biological control of insects. In: Biological Control in crop production (G.C. Papavizas, Ed.) Allanheld, Osmun, Totowa. pp. 129-141.

- Dulmage, H.T., R.S. Soper and D.B. Smith. 1981. The use of bacteria and fungi in insect control. 1st. Japan/USA. Symp. on IPM. Tsvkba, Japan. Sept. 29-30, 1981. pp. 112-122.
- Fast, P.G. 1981. The crystal toxin in Bacillus thuringiensis In: Microbial control of pests and plant diseases. (H.D. Burges, Ed.) Academic Press, London. pp. 223-248.
- Finney, J.R. 1981. Potential of Nematodes for pest control. In: Microbial control of pest and plant diseases (H.D. Burges. Ed.) Academic Press, London. pp. 603-620.
- Guerra, A.A., D.A. Wolfenberger and R.D. García. 1982. Factors affecting reproduction of the tobacco budworm in the laboratory. J. of Econ. Entomol. Vol. 65. No. 5. pp. 1341-1343.
- Hall, I.M. and P.H. Dunn. 1958. Susceptibility of some insect pests. to infection by Bacillus thuringiensis Berliner in laboratory tests. J. Econ. Entomol. Vol. 51. pp. 296-298.
- Hall, I.M. 1963. Microbial control. In: Insect pathology an advanced treatise (E.A. Stein - Haus, Ed.) Vol. 2. Academic Press, New York. pp. 477-517.

- Hannay, C.L. 1953. Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. Nature No. 172. p. 1004.
- Heimpel, A.M. and T.A. Angus. 1963. Diseases caused by certain sporforming bacteria. In: Insect Pathology. An advanced treatise (E.A. Steinhaus, Ed.) Vol. 2. Academic Press, New York. pp. 21-66.
- _____. 1959. The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. J. Insect Pathol. Vol. 1. pp.151-170.
- Ignoffo, C.M. and R.F. Anderson. 1979. Microbial Technology. Microbial Proceses. Academic Press. New York. Vol. 1. pp. 1-27.
- Ignoffo, C.M., T.L. Couch, C. García and M.J. Kroha. 1981. Relative activity of Bacillus thuringiensis var. kurtaki and B. thuringiensis var. israelensis Against larvae of Aedes aegypti, Culex quinquefasciatus, Trichoplusia ni, Heliothis zea, and Heliothis virescens. J. Econ. Entomol. Vol. 74. pp. 218-222.
- Jacobs, M.B. and M.J. Gerstein. 1960. Handbook of Microbiology. D. Van Nostrand, New York. pp. 29-30.

- Johnson, A.W. 1974. Bacillus thuringiensis and tobacco budworm control on Flue - Cured tobacco. J. Econ. Entomol. Vol. 67. pp. 755-759.
- _____. 1978. Effects of tobacco budworm control at different treatment levels with several Insecticides on Flue-Cured tobacco. J. Econ. Entomol. Vol. 71. pp. 183-185.
- Kring, A. 1981. The genus Bacillus: Insect Pathogens. In: The prokaryotes. A. Handbook on habitats, isolation and identification of bacteria (M.P. Starr, et al. Eds) Vol. II Springer - Verlag, Berlin - Heidelberg, New York. pp. 1743-1757.
- Lawrence, A. Lancey and S.M. Mir. 1978. Factors that influence the patogenicity of Bacillus thuringiensis in Black - Flier. XII Congreso Nacional de Entomología. México, D.F. pp. 39-40.
- Lysenko, O. and M. Kucera. 1971. Micro-organisms as spurces of new insecticidal chemicals: Toxins In: Microbial control of insects and mites (H.D. Burges and N.W. Hussey, Eds.) Academic Press, London. pp. 205-227.
- Maldonado, M.G. 1981. Producción de bioinsecticidas de Bacillus thuringiensis GM-1, Utilizando tres diferentes medios de

cultivo. Tesis Q.B.P. Facultad de Ciencias Biológicas,
U.A.N.L. Monterrey, N.L.

Martínez, J. 1983. Patogenicidad de Bacillus thuringiensis
(Berliner) GM-7 - GM-12 sobre Trichoplusia ni (Hubner).
Tesis inédita. I.A.P. Facultad de Agronomía, U.A.N.L.
Marín, N.L.

Mc Garr, R.L., H.T. Dulmage and D.A. Wolfenbarger. 1972. Field
test with HD-1, δ -endotoxina of Bacillus thuringiensis,
and with chemical insecticides for control of the tobacco
budworm and the bollworm in 1970. J. Econ. Entomol.
Vol. 65. pp. 897-899.

Mc Garr, R.L., H.T. Dulmage and D.A. Wolfenbarger. 1970. The
 δ -endotoxin of Bacillus thuringiensis, HD-1, and chemi-
cal insecticides for control of the tobacco budworm and
the bollworm. J. Econ. Entomol. Vol. 63. pp. 1357-1358.

Metcalf, C.L. y W.P. Flint. 1980. Insectos destructivos e in-
sectos útiles, sus costumbres y su control. Décimoterce-
ra impresión. Ed. C.E.C.S.A. México. pp. 67-671.

Mitchell, R. 1974. Introduction to environmental microbiology.
Prentice Hall, Inc. p. 163.

- Murga, M.A. 1983. Toxicidad de Bacillus thuringiensis GM-2 en diferentes medios de cultivo. Tesis Q.B.P. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Monterrey, N.L. México.
- National Academy of Sciences. 1978. Control de plagas y animales. Manejo y control de plagas de insectos. Vol. 3. Ed. Limusa, México. pp. 189-217.
- Norris, J.R. 1971. The protein crystal toxin of Bacillus thuringiensis: Bioynthesis and physical structure. In: Microbial control of insect and mites (H.D. Burges and N.W. Hussey, Eds.) Academic Press. London. pp. 229-246.
- Nuñez, R.C. 1980. Determinación de parasitismo en larvas de Spodoptera frugiperda (Smith). Tesis. I.A.P. Facultad de Agronomía, U.A.N.L. Marín, N.L.
- Ochoa, G.C. 1983. Actividad de la cepa GM-1 de Bacillus thuringiensis (Berliner) en Spodoptera frugiperda (Smith) Tesis I.A.P. Facultad de Agronomía, U.A.N.L. Marín, N.L.
- Potter, M.F., M.P. Jensen and T.F. Watson. 1982. Influence of sweet bait - Bacillus thuringiensis var. kurtaki combinations on adult tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) J. Econ. Entomol. Vol. 75. pp. 1157-1160.

- Prasad, S.S.S.U. and Y.I. Shethna. 1976. Biochemistry and biological activities of the proteinaceous crystal of Bacillus thuringiensis. J. Scient. Ind. Res. Vol. 35. pp. 626-632.
- Ramos G., L.I. 1976. Aislamiento de posibles entomotoxinas producidas por el hongo Metarrhizium anisopliae (Metch). Tesis Maestría, I.T.E.S.M. Monterrey, N.L.
- Smith, H.E. 1978. Pest. Control Strategies. Academic Press. p. 224.
- Splittstoesser, C.M. and F.L. Mc Ewen. 1961. A. Bioassay technique for determining the insecticidal activity of preparations containing Bacillus thuringiensis J. Insect. Pathol. Vol. 3. pp. 391-398.
- Steinhaus, E.A. 1957. Concerning the Harmlessness of insect pathogens and the standardization of microbial control products. J. Econ. Ent. Vol. 50. No. 6. pp. 715-720.
- Steinhaus, E.A. 1979. Enfermedades microbianas de los insectos. In: Control biológico de plagas de insectos y malas hiervas (P. de Bach) Ed. C.E.C.S.A. México. pp. 610-613.
- _____. 1963. Insect. Pathology. An advanced treatise Aca-

demic Press. Vol. II. pp. 28-31, 34-38, 40-44, 46, 437-442.

Wolfenbarger, D.A., A.A. Guerra. H.T. Dulmage and R.D. García.

1972. Properties of the β -exotoxin of Bacillus thuringiensis IMC 10,001 against the tobacco budworm. J. of Econ. Entom. Vol. 65. No. 5. pp. 1245-1248.

